Lehrstuhl für klinische Biochemie der Universität Düsseldorf
Leiter: Prof. Dr. H. Reinauer

Bestimmung der Spurenmetalle Chrom, Cadmium und Zink im Serum von Diabetikern und Normalpersonen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rüdiger Hermann Schütze

1984

UNIV. LEIDEN BIBL.

LEHRSTUHL FÜR KLINISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
LEITER : PROF. DR. H. REINAUER

BESTIMMUNG DER SPURENMETALLE CHROM, CADMIUM UND ZINK IM SERUM VON DIABETIKERN UND NORMALPERSONEN

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON
RÜDIGER HERMANN SCHÜTZE

1 9 8 4

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. : Prof. Dr. A. Hopf

Referent

gez. : Prof. Dr. H. Reinauer

Korreferent

gez. : Prof. Dr. L. E. Feinendegen

Meiner Frau Petra gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Der Begriff Spurenelement	1
1.2.	Ziel der Arbeit	1
2.	Die Spurenmetalle Zink, Chrom und Cadmium sowie ihre essentielle und toxikologische Bedeutung im menschlichen Organismus	2
2.1.	Das Element Zink	2
2.1.1.	Bedeutung als essentielles Spurenmetall, insbesondere im Kohlenhydratstoffwechsel	2
2.1.2.	Toxische Effekte	4
2.2.	Das Element Chrom	4
2.2.1.	Toxikologische Bedeutung	5
2.2.2.	Bedeutung von Chrom als essentielles Spurenmetall sowie seine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel	6
2.3.	Das Element Cadmium	7
2.3.1.	Toxikologische Bedeutung und Metabolismus	8
2.3.2.	Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel	9
3.	Analytische Verfahren	10
3.1.	Prinzip der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	10
3.1.1.	Flammenatomabsorptionsspektroskopie	12
3.1.1.1.	Das Verfahren der externen Standards	15
3.1.1.2.	Bestimmung von Zink im Serum	16
3.1.2.	Flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie mit Hilfe der Graphitrohrtechnik	16
3.1.2.1.	Anwendung des Zeeman-Effekts zur Untergrundkompensation	18
3.1.2.2.	Graphitküvetten und Bestimmung ihrer Farbtemperatur mit Hilfe eines Glühfadenpyrometers	22
3.1.2.3.	Analytik von Chrom und Cadmium mit Hilfe der ZFAAS	26
3.1.2.3.1.	Probenaufarbeitung mit Hilfe der Tieftemperaturveraschung im Sauerstoff-Plasma	27
3.1.2.3.2.	Das Verfahren der Internen Standardaddition	30
3.1.2.3.3.	Bestimmung von Chrom	31
3.1.2.3.4.	Bestimmung von Cadmium	38

3.2..	Referenzmethoden	44
3.2.1.	Prinzip der Inversvoltammetrie (anodic stripping voltammetrie, ASV)	44
3.2.1.1.	Notwendige Probenaufarbeitung	46
3.2.1.2.	Vergleichsmessungen von Cadmium mit Hilfe der DPASV unter Verwendung einer rotierenden Quecksilberfilmelektrode	46
3.2.2.	Prinzip der Neutronenaktivierungsanalyse (NAA)	51
3.2.3.	Bestimmung von Chrom mit Hilfe der NAA und Vergleichsmessungen mit der AAS	53
3.3.	Bestimmung der Blutglukose- und Seruminsulinspiegel	56
4.	Probandenkollektiv	57
4.1.	Probandenkollektiv zur Bestimmung der Metall-Nüchternkonzentrationen im Serum - Kollektiv A -	57
4.2.	Probandenkollektiv zur Bestimmung der Chrom- und Zink-Serumkonzentrationen im Verlauf des oralen Glukose-Toleranztests - Kollektiv B -	58
4.3.	Probennahme, Probenaufbewahrung	59
5.	Methodenkritik	60
6.	Meßergebnisse, Auswertung	63
6.1.	Probandengruppe A	63
6.2.	Probandengruppe B	68
7.	Diskussion	87
8.	Schlußfolgerung	90
9.	Literaturverzeichnis	92

Im Verlauf der letzten Jahre haben Spurenmetalle sowohl im Rahmen von Umweltproblemen und anorganisch-biochemischen Fragestellungen als auch in der Humanmedizin eine wesentliche Bedeutung erlangt, da sie mit einer Reihe von Erkrankungen in Zusammenhang stehen. Es zeichnet sich ab, daß die Funktion dieser Elementspuren und ihre Wechselwirkung in lebenden Systemen erheblich komplexer sind als ursprünglich angenommen wurde. Als Folge dieser Entwicklung werden analytische Forderungen gestellt, die oft bis an die Grenze des methodisch Möglichen gehen und deren Lösung durch Einsatz einer empfindlichen Nachweismethode allein nicht garantiert wird.

1.1. Der Begriff Spurenelement

Unter dem Begriff Spurenelement werden Metalle und einige Nichtmetalle zusammengefaßt, die in lebenden Organismen nur in äußerst geringen Mengen vorkommen.
Man unterscheidet zunächst essentielle Spurenelemente, die vor allem als Bestandteil intracellulärer Enzymsysteme physiologische Funktion besitzen und deren Fehlen charakteristische Mangelzustände verursachen; sie sind jedoch auch toxisch wirksam, wenn sie über einen längeren Zeitraum hinweg in hohen Konzentrationen inkorporiert werden. Zu den essentiellen Spurenelementen zählen u. a. J, Fe, Cu, Zn, Cr, Se.
Von dieser Gruppe grenzt man die potentiell essentiellen sowie die nicht essentiellen Spurenelemente ab, deren überwiegender Teil schon in niedrigen Konzentrationen toxische Effekte verursacht wie beispielsweise Pb, Cd, Hg.

1.2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung möglichst einfacher Bestimmungsverfahren in Humanseren, insbesondere für Cr und Cd im Hinblick auf eine spätere Routineanalytik, der Untersuchung von Matrixeffekten auf die Analyse, Auffindung möglicher Elementverluste und Kontaminationsquellen sowie der Durchführung systematischer Messungen bei Diabetikern und Normalpersonen, um mögliche Zusammenhänge mit dem Kohlhydratstoffwechsel zu erfassen.

2. Die Spurenmetalle Zink, Chrom und Cadmium sowie ihre essentielle und toxikologische Bedeutung im menschlichen Organismus

2.1. Das Element Zink

Zn gehört mit der Ordnungszahl 30 und der Massenzahl 65.4 neben Cd und Hg zur II. Nebengruppe des Periodensystems. Seinem niedrigen Schmelzpunkt von 693.3 K steht ein hoher Siedepunkt von 1181.6 K gegenüber. Aufgrund seines Normalpotentials E_0 = -0.763 V ist es ein elektropositives, leicht oxidables Metall und damit "unedler" als Cd. Es zählt mit einer relativen Häufigkeit von $2.2 \cdot 10^{-2}$% in der Erdrinde zu den selteneren Elementen. Natürlich vorkommende Zn-Verbindungen sind das Sulfid ZnS (Zinkspat), das Carbonat $ZnCO_3$ (Zinkblende) sowie Zn-Silikat (Kieselzinkerz) (1). Metallisches Zn hat große technische Bedeutung. Es findet u.a. vielfach Anwendung als Korrosionsschutz (Verzinken von Eisenblech), bei der Messingherstellung sowie als Elektrodenmaterial (Leclanche Element) (2). Zinkoxid ZnO wird als Pigment, Bestandteil von Salben, Lotionen und Pflastern, bei der Beschwerung von Gummi sowie als Leuchtstoff in Kaltlichtlampen eingesetzt; außerdem ist es Bestandteil vieler Spinelle. $ZnCl_2$ und $ZnSO_4$ besitzen Bedeutung als Herbizide und Antiseptika (1).

2.1.1. Bedeutung als essentielles Spurenmetall, insbesondere im Kohlenhydratstoffwechsel

In einer Vielzahl von Enzymen pflanzlicher und tierischer Organismen spielt Zn eine essentielle Rolle bei deren Funktion bzw. Strukturerhaltung. Einige dieser Zn-Metalloenzyme seien im folgenden aufgeführt :

Carboanhydrase	alk. Phosphatase
Lactatdehydrogenase	Aminopeptidase
Glutamatdehydrogenase	Carboxypeptidase
Malatdehydrogenase	

Der Gesamtzinkgehalt des menschlichen Organismus beträgt ca. 2 g. Hohe Konzentrationen finden sich u.a. im Muskelgewebe, der Knochensubstanz, in Niere, Leber, Prostata sowie der Epidermis. Im Blut sind durchschnittlich 80% des Zn in den Erythrocyten enthalten (Zn-Carboanhydrase) (33).
Zn-Mangelzustände, die tierexperimentell erzeugt, jedoch auch bei Menschen beobachtet wurden, manifestieren sich vor allem in reduziertem Wachstum bzw. Wachstumsstillstand, parakeratotischen Hautveränderungen und Wundheilungsstörungen, Haarausfall sowie Störungen der Testes- und Ovarialfunktion; klinisch spielt ein gestörter Zinkstoffwechsel bei der Hypogeusie, der Sichelzellanämie sowie der Acrodermatitis enteropathica eine entscheidende Rolle (5).
Zn wird vorwiegend im Dünndarm über einen noch nicht bekannten Mechanismus resorbiert, wobei der Resorptionsgrad von der aufgenommenen Zinkmenge und der Anwesenheit anderer zweiwertiger Metallionen (Ca, Cd, Cu) abhängt, wie tierexperimentell bestätigt wurde (34).
Im Blutplasma ist Zn hauptsächlich an Albumin und α_2-Makroglobulin gebunden. Die Ausscheidung erfolgt vornehmlich mit den Faeces, doch auch im Schweiß sind hohe Zn-Konzentrationen enthalten. Dagegen ist die Zn-Ausscheidung im Urin mit 0.3 - 0.6 mg/Tag gering, verglichen mit einer tägl. Aufnahme von 10 - 15 mg. Eine besondere Rolle kommt dem Zink im Kohlenhydratstoffwechsel zu. In den ß-Zellen des endokrinen Pankreas ist Zn angereichert. Hier ist es als Zentralatom verantwortlich für die hexamere Konformation von Insulin, die als Speicherform des Insulins in den Granula der ß-Zellen gilt (38).
Darüberhinaus zeigt sich insbesondere im Tierversuch, daß die Plasma-Insulin-Konzentration nach Glukoseverabreichung bei Zn-Mangeltieren erniedrigt war, wogegen die Konzentration der FFS im Plasma anstieg (35).
Weiterhin scheint gesichert zu sein, daß insulinabhängige Diabetiker vermehrt Zn im Urin ausscheiden, während bei entsprechenden Messungen des Serum- bzw. Plasma-Zn-Gehaltes widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (40-46).

2.1.2. Toxische Effekte

Zn besitzt als Metall eine toxikologische Bedeutung, da es sich aufgrund seines unedlen Charakters leicht in schwachen Säuren löst. Seine Toxizität ist allerdings erheblich niedriger als die des Cd und Hg; der Grenzwert im Trinkwasser wird mit 2 mg/l angegeben; der höchstzulässige Cd-Gehalt beträgt demgegenüber $6 \cdot 10^{-3}$ mg/l. Akute Zn-Massenvergiftungen durch Verwendung zinkhaltiger Gefäße für Speise- und Getränkebereitung wurden Anfang der sechziger Jahre in Kalifornien beobachtet.
Die Betroffenen erkrankten an Tenesmen und Diarrhoen, z.T. mit Blutabgang; Todesfälle wurden nicht beschrieben. Eine akute gewerbliche Zn-Vergiftung stellt das sogenannte 'Gießfieber' dar, das bei der Verarbeitung von geschmolzenem Zn und seinen Legierungen beobachtet wird und darauf beruht, daß flüssiges Zn an der Luft oxidiert und als ZnO-Nebel inhaliert wird. Die akute Symptomatik beginnt mit Abgeschlagenheit, Gelenk- und Muskelschmerzen, dann treten Schüttelfrost, Husten und später Schweißausbrüche hinzu; innerhalb von 24 Stunden erfolgt jedoch in der Regel restitutio ad integrum; der MAK-Wert für ZnO-Staub beträgt 5 mg/m^3 Luft.
Das offizinelle, in Pudern und Salben verarbeitete ZnO hat auch zu medizinalen Vergiftungen geführt, wenn von größeren Wundflächen aus toxische Mengen resorbiert wurden. Versehentlich oral aufgenommenes ZnO führt zu Übelkeit, Erbrechen und lang anhaltender Gastritis (17).

2.2. Das Element Chrom

Das Metall Cr, Ordnungszahl 24, Massenzahl 51.9, gehört wie das Zn zur 1. Übergangsperiode. Zusammen mit Molybdän und Wolfram bildet es die VI. Nebengruppe des Periodensystems. Das silberweiße, dehn- und schmiedbare Metall mit einem Schmelzpunkt von 2140 K und einem Siedepunkt von 2945 K kommt mit einem relativen Anteil von $6.4 \cdot 10^{-3}$% in der Erdkruste nicht gediegen, sondern hauptsächlich als $FeCrO_4$ (Chromeisenstein) und als $PbCrO_4$ (Rotbleierz) vor. Seine Stellung innerhalb der Spannungsreihe hängt von seiner Vorbehandlung ab; in reduzierender Lösung ist Cr bei einem Normalpotential von -0.74 V instabil; mit Oxidationsmitteln vorbehandelt

verhält es sich weitgehend inert und liegt mit einem E_0 = +1.33 V zwischen Quecksilber und Gold.
Gegenüber Cd und Zn sind Oxidationsstufen von -2 bis +6 möglich, wobei allerdings nur das +3-wertige Kation weitgehend stabil ist und aufgrund seiner d-Elektronenstruktur eine Vielzahl koordinativer Bindungsmöglichkeiten besitzt (15). Bezüglich der technischen Verwendung wird Chrom elementar als Legierungsbestandteil mit Fe und hauptsächlich Ni zur Herstellung korrosionsfreier Stähle sowie bei der Verchromung von Eisenblechen als Oberflächenschutz verwendet. Von seinen Verbindungen besitzen die Chromate große Bedeutung, deren oxidierende Eigenschaft in der chemischen Großindustrie zur direkten und katalytischen Oxidation ausgenutzt wird; darüberhinaus werden Chromate in der Gerberei, zum Beizen von Holz sowie in der Farbstoffindustrie (Chromfarben) eingesetzt (22).
Das ferromagnetische Chromdioxid CrO_2 findet Anwendung bei der Herstellung von Tonbändern.

2.2.1. Toxikologische Bedeutung

In diesem Zusammenhang sind ausschließlich Cr^{6+}-Verbindungen zu diskutieren, da sie wesentlich besser als Cr^{3+}-Verbindungen resorbiert werden (56). Akute, tödliche Vergiftungen unter tiefgreifender Ätzwirkung können schon durch orale Aufnahme von 1 - 2 g Chromtrioxid zustande kommen; die Letaldosen für das in Laboratorien allgemein gebräuchliche Kaliumdichromat $K_2Cr_2O_7$ liegen bei 4 - 8 g (22).
Für die schädigende Wirkung an biologischen Membranen soll das hohe Oxidationspotential des Cr^{6+} verantwortlich sein, wobei ein Valenzwechsel zum Cr^{3+} erfolgt (50).
Nach subkutaner oder intratrachealer Aufnahme werden wasserlösliche Cr^{6+}-Salze in der Lunge gespeichert, während nach oraler Aufnahme der Großteil mit den Faeces als Cr^{3+} wieder ausgeschieden wird.
Akute orale Chromatvergiftungen verursachen rasch Leibschmerzen, Übelkeit, blutiges Erbrechen; weiterhin treten schleimig-blutige Durchfälle hinzu; der Tod tritt durch Anämie und Nierenversagen ein (22).
Chronische Einwirkung von Chromatstaub führt im Bereich kleinster Hautläsionen zu lochförmigen, sich ausbreitenden, schlecht heilenden

Geschwüren; seine Inhalation verursacht Katarrh und Nekrosen der Nasenschleimhaut (Nasenseptumperforation). Darüberhinaus vermag Chrom hyperergische Reaktionen mit Ausbildung von Ekzemen auszulösen; bekannt ist das sogenannte 'Maurerekzem' durch chromathaltigen Zement (22).
Unumstritten ist die cancerogene Wirkung von Cr^{6+}-Verbindungen. Die Entstehung von Bronchialkarzinomen durch Chromatstaubinhalation wurde vielfach nachgewiesen. Betroffen sind vor allem Betriebe, die Chromat und Chromatpigmente herstellen, Cr elektrolytisch verarbeiten sowie Industrien, die Chromstähle erzeugen (51, 53-55).
Der MAK-Wert für CrO_3 beträgt 0.1 mg/m^3 Luft, als Grenzwert im Trinkwasser werden 0.05 mg/l angegeben (22).

2.2.2. Bedeutung von Chrom als essentielles Spurenmetall sowie seine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel

Der erste Hinweis auf eine biologische Bedeutung von Chrom im Stoffwechsel stammt aus enzymatischen Studien; das Cytochrom-Succinat-Dehydrogenase-System, ein wichtiges Enzym der Atmungskette, zeigte unter der Einwirkung von Cr einen starken Anstieg seiner Aktivität. Eine signifikante Stimulierung der Phosphoglucomutase durch Cr wurde von Strickland beschrieben (16). Weiterhin zeigte sich, daß Chrom in der Leber die Synthese von Fettsäuren und Cholesterin aus Acetat fördert (5).
Bei der Betrachtung des Metabolismus spielt die Wertigkeit des Cr eine Rolle, wobei im biologischen Bereich ausschließlich 3- und 6-wertige Valenzstufen zu diskutieren sind (59). Dreiwertiges Cr, oral aufgenommen, verläßt den Körper zu 99% mit den Faeces; der Rest erscheint an ß-Globuline gebunden zunächst im Blutplasma, ohne in die Erythrocyten einzutreten. Nach wenigen Stunden ist Cr^{3+} nicht mehr im Plasma zu finden, jedoch in verschiedenen Körpergeweben längere Zeit nachweisbar (56).
Relativ hohe Cr-Gehalte weisen Knochengewebe, Haare, Lunge, Milz, Leber und Testes auf (59). Das resorbierte Cr^{3+} wird renal ausschließlich durch glomeruläre Filtration bei 63% tubulärer Rückresorption eliminiert (52).
Sechswertige Chromverbindungen werden vornehmlich durch Hautkontakt oder inhalativ aufgenommen. Trotz seines hohen Oxidationspotentials muß Cr^{6+} kurfristig im Blutstrom vorhanden sein, da Chrom allein in dieser Wertig-

keitsstufe die Erythrocytenmembran zu durchdringen vermag, wobei anschließende Reduktion zum Cr^{3+} eintritt (50). Im Gegensatz zu anderen Spurenmetallen nimmt der Gesamtgehalt des Organismus an Chrom mit zunehmendem Alter ab (60). Neben dem Einfluß auf Lipid- und Proteinstoffwechsel scheint Chrom auch in den Glukosestoffwechsel einzugreifen und eng mit der Wirkung des Insulins verknüpft zu sein. In einer Vielzahl tierexperimenteller Studien ergab sich bei Chrommangeltieren eine erniedrigte Glukosetoleranz, die sich durch orale oder i.v. Cr-Zufuhr wieder beseitigen ließ. Weiterhin wurde eine Erhöhung des Chromspiegels im Blut von Ratten nach Insulinapplikation beobachtet. In-vitro-Versuche ergaben, daß insulinempfindliches Gewebe bei der Aufnahme von Glukose in die Zelle erhöhte Insulinmengen in Abwesenheit von Cr benötigte (56).
Studien in Entwicklungsländern zeigen, daß Auswirkungen einer Eiweißmangelernährung durch zusätzlichen Chrommangel verstärkt werden, der sich durch Verschlechterung der Glukosetoleranz bemerkbar macht. Außerdem wurden Chrommangelzustände nach langdauernder parenteraler Ernährung beschrieben mit deutlich beeinträchtigter Glukoseutilisation (6). Darüberhinaus scheint beim insulinpflichtigen Diabetes mellitus eine Abnahme der Chromvorräte im Organismus vorzuliegen, während der niedrigere Gesamtchromgehalt des Körpers im Alter mit der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II in Zusammenhang gebracht wird (56). Welche Cr-Verbindung in den Glukosestoffwechsel eingreift, ist noch nicht endgültig geklärt. Bei dem diskutierten Glukosetoleranzfaktor (GTF) handelt es sich möglicherweise um einen niedermolekularen, oktaedrisch konfigurierten Cr^{3+}-Komplex, in dem Nikotinsäure, Cystein, Glycin und Glutaminsäure als Liganden fungieren (28,30). In Form dieses Komplexes soll Chrom drei- bis viermal so gut resorbiert werden wie anorganische Chromverbindungen (28).

2.3. Das Element Cadmium

Das Schwermetall Cd, Ordnungszahl 48, Massenzahl 112,4, findet sich in der Natur bei einer relativen Häufigkeit von 1.0 10^{-5}% stets vergesellschaftet mit Zink und fällt daher als Nebenprodukt bei der Röstreduktion von Zinkblende an. Das weiche, silberweiße Metall besitzt einen niedrigen Schmelzpunkt von 574 K und siedet bei 1041 K (7).

Bezüglich seines chemischen Verhaltens besteht weitgehend Übereinstimmung mit Zn; so ist auch beim Cd nur die +2-wertige Oxidationsstufe stabil. Allerdings besitzt es gegenüber Zn ein positiveres Normalpotential von E_o = -0.4092 V bezüglich der Reaktion $Me \longrightarrow Me^{+2} + 2e$ und wird von nicht-oxidierenden Säuren kaum angegriffen (7). Darüberhinaus zeigt Cd eine stärkere Affinität zu S- und P-haltigen Liganden als Zn (3).
Technisch wird die Hauptmenge des Metalls als Legierungsbestandteil gebraucht und außerdem in der Rostschutzanwendung und als Elektrodenmaterial eingesetzt. Cd-Verbindungen wie CdS und $CdWO_4$ sind in vielen Bereichen eingesetzte Pigmente.

2.3.1. Toxikologische Bedeutung und Metabolismus

Cd zählt zu den stark toxischen Metallen, da es einerseits Proteine denaturiert, zum anderen aufgrund seiner hohen Affinität zu Mercaptogruppen 2-wertige Kationen wie Ca, Fe, Cu, Zn aus SH-haltigen Enzymen verdrängt und diese inaktiviert (23,33,70).
Oral zugeführtes Cd wird zu etwa 6% resorbiert, während der überwiegende Teil mit den Faeces ausgeschieden wird (29). Aufgrund der hohen Halbwertszeit des resorbierten Anteils, die zwischen 16 und 33 Jahren angegeben wird, nimmt der Cd-Gehalt des Gesamtorganismus mit steigendem Alter zu; hierauf beruht auch der Grund zur Akkumulation des Cd in der Nahrungskette (81).
Hauptspeicherorgane sind neben Pankreas, Lunge, Milz, vor allem Leber und Niere, wo sich das Metall im Bereich der proximalen Tubuli anhäuft (69). Diese Anreicherung im Bereich der Nierenrinde wird darauf zurückgeführt, daß Cd im Blutplasma hauptsächlich an Metallothionein gebunden ist, ein niedermolekulares Protein (MG = 7000), das glomerulär filtriert und tubulär reabsorbiert wird (71); demnach liegt die Cd-Konzentration im Urin mit < 1 µg/l recht niedrig (36).
Folgen einer chronischen Cd-Intoxikation sind daher neben Osteomalazien vor allem Tubulusdefekte, die ähnlich dem Fanconi-Syndrom in Proteinurie ($ß_2$-Microglobulin), Glukosurie, Aminoacidurie und Hyperphosphaturie bestehen bei gleichzeitig ansteigender renaler Cd-Ausscheidung (72).
Ein derartiges Syndrom wurde Ende der fünfziger Jahre unter dem Namen

'Itai-Itai-Krankheit' bekannt, wobei die Betroffenen jahrelang in der Nahrungskette angereichertes Cd aus Zinkhüttenabwässern aufgenommen hatten. Die Symptomatik der akuten Cd-Vergiftung macht sich bei inhalativer Aufnahme von CdO-Rauch durch Reizzustände im Nasen- und Rachenbereich, durch Husten sowie Kopf- und Brustschmerzen mit zusätzlicher Atemnot bemerkbar; bei massiver Intoxikation kann es nach einer Latenzzeit von zwei bis vier Tagen zu einem tödlichen Lungenödem oder Kreislaufkollaps kommen. Oral aufgenommenes Cd wie auch CdO führt zu gastrointestinalen Beschwerden mit vermehrtem Speichelfluß, heftigem Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall mit Tenesmen. Als Dosis letalis bei oraler Zufuhr wird 30 - 40 mg Cd angegeben (29).

2.3.2. Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Von Singhal et al. (8) wurde tierexperimentell an Cd-belasteten Ratten nachgewiesen, daß Cd einen Einfluß auf den KH-Stoffwechsel besitzt. Hierbei zeigten sich nach einer 2xtäglichen Cd-Gabe von 1 mg/kg KG über eine Woche erhöhte Blutglukose und supprimierte Insulin-Spiegel; darüberhinaus ergab sich bei Glukose-Belastung eine signifikante Erniedrigung der Glukose-toleranz und Insulinfreisetzung; Seiller et al. (80) beobachteten bei In-vitro-Versuchen an Nierenrindengewebe von Ratten nach Cd-Belastung eine Abnahme der Glukoneogenese aus Glutaminat und Pyruvat um ca. 50%. Eine physiologische Bedeutung von Cd im Stoffwechsel ist bisher nicht bekannt.

3. Analytische Verfahren

Als analytische Verfahren wurden die Flammenatomabsorptionsspektroskopie sowie die Flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie im elektromagnetischen Feld eingesetzt; als Referenzmethoden standen die Differentialpuls-Anodic-Stripping-Voltammetrie (DPASV) und die Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) zur Verfügung.

3.1. Prinzip der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Freie Atome (Atomdampf) im Grundzustand E_j sind imstande, elektromagnetische Strahlung definierter Frequenz zu absorbieren und in einen angeregten Zustand E_k überzugehen. Die hierzu erforderliche Energie ergibt sich zu

$$E = E_k - E_j = h \cdot \nu \qquad (1)$$

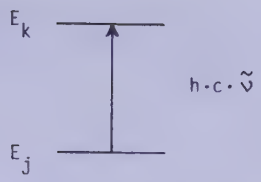
In dieser sog. Rohr-Einstein'schen Frequenzbeziehung ist h das Planck'sche Wirkungsquantum in [erg·s] und ν die Strahlungsfrequenz in s^{-1}; die Wellenlänge λ ist über $c = \nu \cdot \lambda$ mit der Frequenz ν verknüpft; daraus folgt mit Einführung der Wellenzahl $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ aus (1)

$$E = E_k - E_j = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \qquad (2)$$

bzw.

$$\tilde{\nu} = \frac{E_k}{h \cdot c} - \frac{E_j}{h \cdot c} = T_k - T_j \qquad (3)$$

als die Differenz zweier Terme in cm^{-1} bzw. Energiebetrag, der zur Anregung eines Elektrons in einen energetisch höher liegenden Zustand erforderlich ist:



Da in atomaren Systemen keine Schwingungs- und Rotationszustände existieren, resultieren im Vergleich zu Molekülspektren (Bandenspektren) scharfe Emissions- bzw. Absorptionslinien (Linienspektren).
Der Energiebetrag $h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$, der pro Volumen und Zeiteinheit absorbiert werden kann, ist proportional der Zahl N freier Atome, der spektralen Strahlungsintensität S_ν, der Resonanzfrequenz sowie der Lichtenergie $h \cdot \nu_{jk}$

$$E_{abs} = B_{jk} \cdot S_\nu \cdot h\nu_{jk} \cdot N \qquad (4)$$

Das Produkt $B_{jk} \cdot S$ mit der Übergangswahrscheinlichkeit B beinhaltet den Bruchteil aller Atome, die im Grundzustand vorhanden sind und Licht der Energie $h \cdot \nu_{jk}$ absorbieren können, wobei pro Zeiteinheit eine Strahlungsmenge $S_\nu \cdot c$ eine bestimmte Volumeneinheit durchdringt.
Mit Einführung des atomaren Absorptionskoeffizienten

$$æ_{jk} = \frac{h \cdot \nu}{c} \cdot B_{jk} \qquad (5)$$

als Maß für den Wirkungsquerschnitt eines Atoms in cm^2 folgt schließlich aus Gleichung (4):

$$E_{abs} = æ_{jk} \cdot S \cdot c \cdot N \qquad (6)$$

Bei quantitativen praktischen Messungen ist es sinnvoller, das Lambert-Beer'sche Gesetz anzuwenden (73); für die Abschwächung der Lichtintensität bei Durchtritt durch ein absorbierendes Medium der Schichtdicke 1 gilt folgender Ansatz:

$$-dI = I \cdot æ_\nu \cdot 1 \cdot dN \qquad (7)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ergibt sich zu

$$I_{\nu,l} = I_{\nu,0} \cdot e^{-\varkappa_\nu N \cdot l} \qquad (8)$$

bzw.

$$\log \frac{I_{\nu,0}}{I_{\nu,l}} = 2.303 \cdot \varkappa_\nu \cdot N \cdot l \qquad (9)$$

Hierbei ist $I_{\nu,0}$ und $I_{\nu,l}$ die Lichtintensität vor und nach Passage durch die absorbierende Schicht und $\varkappa_\nu$ der spektrale Absorptionskoeffizient. Der Ausdruck $\log I_0/I_l$ als Maß für die Lichtschwächung wird als Extinktion bezeichnet; darüberhinaus werden in der Absorptionsspektroskopie häufig die Ausdrücke Durchlässigkeit $D = I_l/I_0$ und Absorption $A = 1-I_l$ angewandt.

3.1.1. Flammenatomabsorptionsspektroskopie

Atomabsorptionsmessungen mit Hilfe der Flammentechnik zählen in der Spurenelementanalytik zu den Routineverfahren, die bei einfacher Handhabung einen hohen Probendurchsatz erlauben, wobei auch in komplexen organischen Matrices gemessen werden kann, da sich Störeffekte weniger bemerkbar machen als bei elektrothermalen Methoden. Eine gesonderte Probenaufarbeitung ist in der Regel nicht erforderlich, sofern das Analysenmaterial in gelöster Form vorliegt. Allerdings liegt die Nachweisgrenze um den Faktor 50 - 100 höher im Vergleich zur flammenlosen AAS. Bei dem Verfahren wird die zu analysierende Lösung von einem Zerstäuber angesaugt, gelangt als Aerosol unter Zutritt der Brennergase in eine Mischkammer und schließlich in den Bereich der Brennerflamme, wo die Zersetzung des analytischen Materials und der Atomisierungsprozeß simultan stattfinden. Hiebei laufen im einzelnen folgende Vorgänge anhand einer gegebenen Verbindung MA ab (32):

1) Überführung der Probe in die Gasphase

$MA_s \longrightarrow M^+ + A^-$	Solvation, Bildung eines Flüssigaerosols
$MA_{solv} \longrightarrow MA_s$	Desolvation in der Flamme, Bildung eines Feststoffaerosols
$MA_s \longrightarrow MA_l$	Schmelzvorgang
$MA_l \longrightarrow MA_v$	Verdampfung
$MA_s \longrightarrow MA_v$	Sublimation

2) Zersetzung und Atomisierung (Dissoziation)

$MA_v \longrightarrow M^o + A^o$	Dissoziation (Atome im Grundzustand)
$MA_v \longrightarrow M^* + A^*$	Anregung
$MA_v \longrightarrow M^+ + A^-$	Ionisation
$MA_v \longrightarrow MA^*$	Erzeugung angeregter Moleküle

3) Reaktionen zwischen dem zu messenden und anderen Elementen der Matrix

$M + M' + O \longrightarrow MOM'$	Doppeloxidbildung
$MA + B \longrightarrow MB + A$	Anionenaustausch
$MB \longrightarrow M + B$	erneute Dissoziation

4) Reaktion zwischen dem zu bestimmenden Element und den Flammengasen:

Bildung u.a. von Oxiden, Hydroxiden, Carbonaten

Zwischen der Konzentration des zu bestimmenden Elementes in der Analysenlösung und im Bereich der Flamme wurde von Winefordner und Vickers eine Beziehung aufgestellt, in der als wesentliche Parameter die Gasströmung, die Ansauggeschwindigkeit und der Verdampfungsgrad eingehen (32).
Der Strahlengang in einem Zweistrahlgerät sei anhand des folgenden Blockbildes dargestellt (Abb. 1).

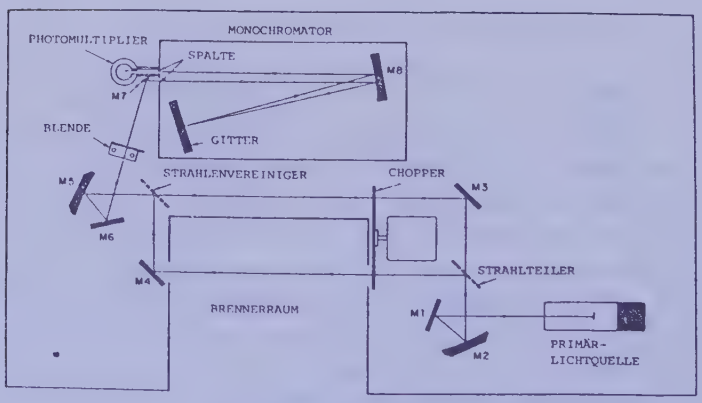


Abb 1: Schematischer Aufbau eines Zweistrahl-Flammenatomabsorptionsphotometers und Verlauf des Strahlenganges

3.1.1.1. Das Verfahren der externen Standards

Zur Ermittlung unbekannter Elementkonzentrationen können externe Standards in der Regel dann eingesetzt werden, wenn die Konzentration des betreffenden Elements in der Probe hoch ist (100 - 1000 µg/l) und bei genügender Empfindlichkeit eine komplexe Matrix um den Faktor 5 - 10 verdünnt werden kann. Unter diesen Bedingungen zeigen wäßrige Standards und die jeweilige Probe bei gleichen Konzentrationswerten gleiche Extinktion, so daß mit Hilfe von Bezugslösungen bekannter Konzentration über eine Eichgerade die unbekannte Metallkonzentration ermittelt werden kann (Abb. 2).

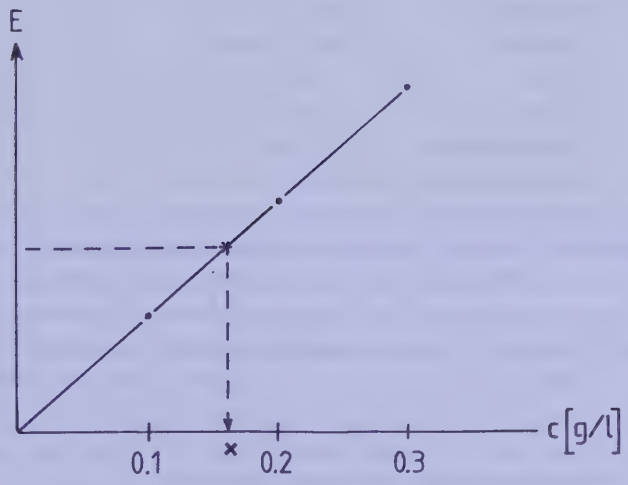


Abb. 2: Erstellung einer Eichgeraden mit externen Standards zur Ermittlung einer unbekannten Analytkonzentration x

3.1.1.2. Bestimmung von Zink im Serum

Da die Zn-Konzentrationen im Serum um den Faktor $5 \cdot 10^3$ höher liegen als die entsprechenden Cr- und Cd-Werte und die Zn-Nachweisgrenze mit der Flammentechnik etwa 1 µg/l beträgt, wurden die Serumproben nach 1:5-Verdünnung mit Wasser gegen externe Standards vermessen. Unter diesen Bedingungen sind Matrixeffekte vernachlässigbar.
Sämtliche Bestimmungen wurden am Atomabsorptions-Spektrophotometer 2380 der Fa. Perkin-Elmer unter Einsatz einer EDL-Lampe (electrodeless discharge lamp) in der Acetylen/Luft-Flamme bei nachfolgenden Parametern bestimmt:

Wellenlänge	:	213.9 nm
Spalt	:	0.7 nm
Lampenstrom	:	15 mA
Gasgemisch	:	2.6 l/min C_2H_4 22.4 l/min Preßluft
Auswertverfahren	:	CONT
Integrationszeit	:	1.5 sec

Die Eichung erfolgte über wäßrige Zn-Standards (Titrisol, Merck) der Konzentration 100, 200, 300 µg/l, wobei ein in der Apparatur integrierter Rechner die Extinktion der jeweils gemessenen Bezugslösung dem betreffenden Konzentrationswert zuordnet und eine Eichgerade erstellt. Je Probe wurden acht Einzelmessungen durchgeführt; bei Konzentrationen um 1000 µg/l betrug die relative Standardabweichung für $\bar{x}$ im Mittel 3%.

3.1.2. Flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie
mit Hilfe der Graphitrohrtechnik

Die elektrothermale AAS hat in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung gewonnen, da mit diesem Verfahren Spurenmetallkonzentrationen unterhalb des ppb-Bereichs meßbar sind und Probenmaterial auch in fester Form bestimmt werden kann.

Im Gegensatz zur Flammen-AAS erfolgt die Trocknung, Zersetzung, Verdampfung und Atomisierung des Analysates in der Graphitküvette nicht simultan, sondern in aufeinanderfolgenden Schritten bei jeweils verschiedener Temperatur. Die hohe Empfindlichkeit der Methode ist Folge einer verlängerten Verweildauer der Atome im Strahlengang; ebenso erhöht sich jedoch die unspezifische Absorption, so daß Matrixeffekte stärker zur Geltung kommen als bei der Flammentechnik. Störeinflüsse der spezifischen Absorption erfolgen durch überlagerte Molekülbanden, eng benachbarte fremde Absorptionslinien sowie Streulichtabsorption, die im wesentlichen durch Rauchentwicklung während der Atomisierungsphase verursacht wird; diese Effekte bewirken eine Erhöhung der spezifischen Absorption und täuschen zu hohe Konzentrationen vor. Darüberhinaus kann es zu Atomisierungsverlusten kommen durch

1. Verspritzen und Aufschäumen flüssigen Probenmaterials infolge zu rascher Temperatursteigerung in der Trocknungsphase,

2. eine zu hohe Zersetzungstemperatur,

3. zu große Probenvolumina,

4. Diffusion des Atomdampfes in die Küvettenwandung, Entweichen durch die Küvettenöffnungen sowie Konvektion in den Bereich kälterer Küvettenzonen und dort erfolgende Kondensation (14),

5. chemische Reaktion mit dem Graphitmaterial und dem Schutzgas (Carbid-, Nitrid- und Cyanidbildung) (18,19).

Aus diesen Gründen ist neben einer optimalen Einstellung der Geräteparameter eine zuverlässige Untergrundkompensation Voraussetzung bei der Analytik in komplexen Probenmaterialien. Der Einsatz einer kontinuierlichen Lichtquelle (Deuteriumlampe) zur Korrektur der unspezifischen Absorption hat den Vorteil der Verwendungsmöglichkeit über einen weiten Wellenlängenbereich. Die Methode versagt jedoch bei Molekülbanden mit merklicher Rotationsfeinstruktur (66), da die Halbwertsbreite der Erregerlinie mit 0.002 nm um den Faktor 10^2 kleiner ist als die Breite des Kontinuums, die

je nach vorgegebenem Spalt bei 0.2 - 0.7 nm liegt. Zur Erläuterung dient die folgende Abb. 3

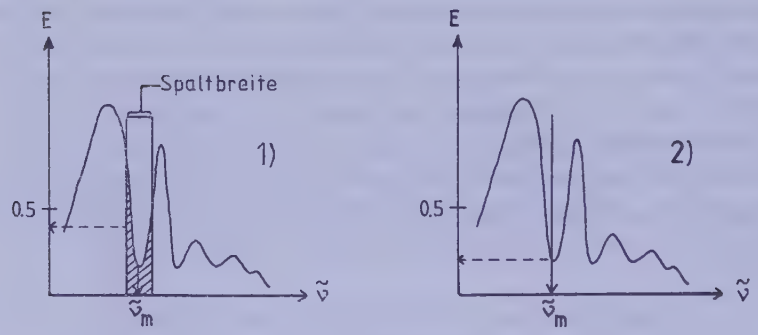


Abb. 3: Korrektur der unspezifischen Absorption im Bereich stark strukturierter Molekülbanden;
1) bei Verwendung einer kontinuierlichen Lichtquelle (Deuteriumlampe),
2) im Fall der Zeeman -Methode, bei der die korrekte Untergrundabsorption an der Stelle des zu messenden Übergangs registriert wird. $(\tilde{\nu}_m)$

Das gleiche Problem entsteht beim Auftreten spektraler Interferenzen, wenn Absorptionslinien anderer Atome in direkter Nachbarschaft des zu messenden Übergangs liegen (73). Darüberhinaus ist für eine korrekte Untergrundmessung eine Angleichung der Intensität beider Lichtquellen Voraussetzung (67). Ein effektives Verfahren bietet die Ausnutzung der unterschiedlichen elektromagnetischen Eigenschaften von Molekülen und Atomen.

3.1.2.1. Die Anwendung des Zeeman-Effekts zur Untergrundkompensation

Ein durch die Gesamtdrehimpulsquantenzahl J gekennzeichneter Atomzustand spaltet im magnetischen Feld in 2J + 1 Energieniveaus auf; die entsprechende Aufspaltung der Spektrallinien bezeichnet man als Zeeman-Effekt, die

analoge Aufspaltung in Absorption als inversen Zeeman-Effekt (Abb. 4). Besitzt das Atom einen Gesamtspin S = 0, das heißt, handelt es sich um Singuletterme, so ist die Energiedifferenz benachbarter Termkomponenten im Magnetfeld für die einzelnen J-Zustände konstant und gemäß $\Delta E = \mu_B \cdot H$ proportional dem angelegten Magnetfeld. Infolge der Auswahlregel für die Magnetquantenzahl M mit $\Delta M = 0, +1, -1$ beobachtet man die Aufspaltung einer Absorptionslinie in drei Komponenten (4). Die durch $\Delta M = 0$ unverschobene Linie wird auch mit π, die verschobenen Komponenten mit σ^+ und σ^- bezeichnet; darüberhinaus zeigt sich eine Polarisation der π-Komponente in Feldrichtung, während die σ-Komponenten senkrecht dazu polarisiert sind (9). Ein Zeeman-Triplett beobachtet man bei den Erdalkalimetallen sowie Cd, Hg, Zn, Pb, Pd, Sn.

Für Nichtsingulettzustände und damit für die meisten Übergangsmetalle u.a. für Chrom sind die Aufspaltungen komplexer, da gemäß $\Delta E = \mu_B \cdot g(L,S,J) \cdot H$ der Abstand der Termkomponenten vom unverschobenen Term und die Energiedifferenz benachbarter Spaltterme von den Quantenzahlen L, S, J abhängen und für den oberen und unteren Zustand nicht mehr gleich sind; da jedoch der Landé-Faktor g stets eine rationale Zahl ist, sind die zusätzlichen Komponenten stets ein rationales Vielfaches der normalen Aufspaltung (4). Die resultierenden π und σ-Multipletts sind wiederum in Feldrichtung und dazu senkrecht polarisiert.

Diese Phänomene lassen sich zur Untergrundkompensation ausnutzen, indem senkrecht zum Strahlengang im Bereich der Absorptionszelle ein äußeres Magnetfeld angelegt wird. Um in diesem Fall jedoch Absorption messen zu können, ist polarisiertes Licht notwendig. Wird ein zwischen Lichtquelle und Probenraum liegender Polarisator so ausgelegt, daß er abwechselnd in Feldrichtung und dazu senkrecht polarisiertes Licht erzeugt, so erfolgt einmal simultan spezifische sowie Untergrundabsorption, im zweiten Zyklus lediglich unspezifische Absorption; die ebenfalls senkrecht zur Feldrichtung polarisierten σ-Komponenten absorbieren nicht, da sie gegenüber der Erregerlinie verschoben sind.

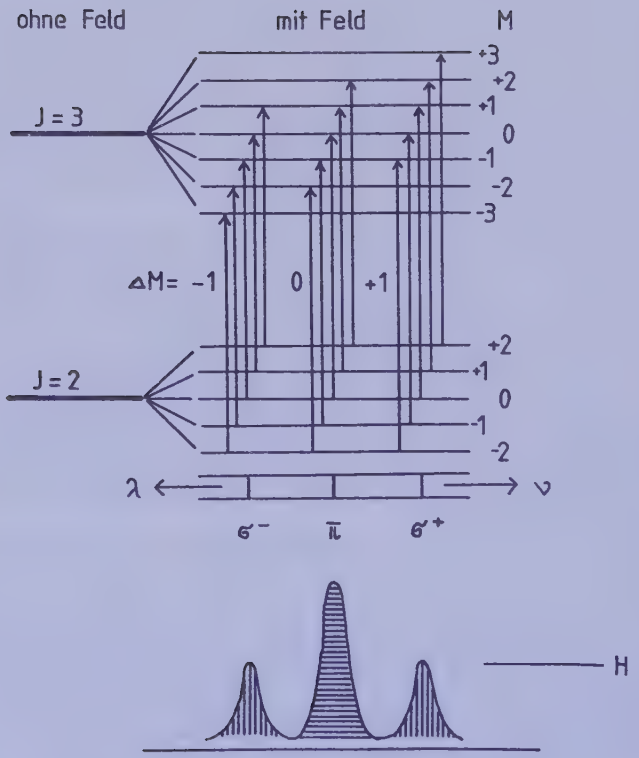


Abb. 4: Zeeman-Effekt - Aufspaltung der Terme durch ein Magnetfeld H und Polarisation der resultierenden Komponenten

Das Intensitätsverhältnis von $I_{\overline{\pi}} = I_{\parallel}$ und $I_{\sigma} = I_{\perp}$ ist für ein konstantes Mangnetfeld im Bereich des Probemraumes gegeben zu:

$$\frac{I_{\sigma}(H)}{I_{\overline{\pi}}(H)} = \frac{\exp\left[-\text{æ}^{a}_{H,\sigma}(\nu_a) - \text{æ}^{b}(\nu_a)\right]}{\exp\left[-\text{æ}^{a}_{H,\overline{\pi}}(\nu_a) - \text{æ}^{b}(\nu_a)\right]} \quad \text{daraus folgt}$$

$$\log \frac{I_{\sigma}(H)}{I_{\overline{\pi}}(H)} = 0.43 \left[\text{æ}^{a}_{H,\overline{\pi}}(\nu_a) - \text{æ}^{a}_{H,\sigma}(\nu_a)\right] = n_A$$

Hierbei sind æ^{a} und æ^{b} die Koeffizienten für spezifische und Untergrundabsorption, ν_a die Absorptionsfrequenz und n_A die Analytkonzentration. Die Differenz log $I_{\sigma}(H)$ - log $I_{\overline{\pi}}(H)$ ist proportional der Analytkonzentration und abhängig von der Feldstärke; im Fall des normalen Zeeman-Effekts ist $\text{æ}^{a}(\nu_a, H, \overline{\pi}) \cdot \text{æ}^{a}(\nu_a)$, d.h. man beobachtet gegenüber der konventionellen Deuterium-Kompensation nur eine geringe Schwächung der relativen Absorption, sofern ein genügend starkes Feld angelegt wird. Beim anomalen Zeeman-Effekt zeigt sich jedoch eine deutliche Abnahme der relativen Absorptionsintensität, da infolge der $\overline{\pi}$-Aufspaltung $\text{æ}^{a}(\nu_a, H, \overline{\pi}) < \text{æ}^{a}(\nu_a)$ ist (66).
Im folgenden sind die relativen Absorptionsintensitäten für Cd und Cr in Abhängigkeit von der Feldstärke im Vergleich zur Standard-D_2-Methode aufgeführt (67).

	nm	3	6	9	12	15	Feldstärke kG
Cd	228.8	0.36	0.79	0.90	0.91	0.89	
Cr	357.9	0.69	0.61	0.46	0.36	0.30	
Cr	359.3	0.87	0.81	0.65	0.49	0.35	

Die Vorteile der Zeeman -Methode können wie folgt zusammengefaßt werden:

1) Einsatz einer Lichtquelle zur Messung spezifischer und Untergrundabsorption;
2) Meß- und Vergleichsstrahl haben gleiche Wellenlänge,
3) hohes Signal/Rausch-Verhältnis,
4) Verwendung einer Emissionslinie zur Kompensation, dadurch Erfassung strukturierter Molekülbanden,
5) kein Auftreten spektraler Interferenzen.

Als Nachteile sind zu nennen:

1) geringere Empfindlichkeit gegenüber der D_2-Kompensation, insbesondere bei Nichtsingulettatomen;
2) verkürzte Linearität der Eichgeraden bei hoher Analytkonzentration, besonders beim anomalen ZE als "roll-over" sichtbar (67);
3) keine Untergrundkompensation möglich, wenn unspezifische Absorption durch das Magnetfeld beeinflußt wird (OH-Bande).

Die Anordnung der Meßapparatur zeigt Abb. 5 auf Seite 23.

3.1.2.2. Graphitküvetten und Bestimmung ihrer Farbtemperatur mit Hilfe eines Glühfadenpyrometers

Sämtliche Analysen wurden mit 'cup-type'-Graphitküvetten der Fa. Ringsdorff-Werke/Bonn durchgeführt (s. Abb. 7), die gegenüber den meist verwendeten 'tube-type'-Rohren eine zentrale tiegelförmige Vertiefung zur Aufnahme von max. 50 µl flüssigen Probenmaterials besitzen. Neben dem Vorteil, bei manueller Injektion der Proben das Analysat an einer definierten Stelle der Küvette unterhalb des Strahlenganges plazieren zu können, läßt sich die Trocknungsphase durch die große Injektionsöffnung von 4 mm Ø gut verfolgen; weiterhin werden Matrixbestandteile im Zersetzungsschritt rasch eliminiert, wobei sich allerdings Elementverluste bei nicht optimal eingestellter Temperatur vermehrt bemerkbar machen. Es standen vier unterschiedliche 'cup-type'-Küvetten zur Verfügung:

1) Standardgraphit, RWO 452 (grobkörnig, mit leichtem Abrieb),

2) Standardgraphit pyrolysiert, RWO 452-PyC (Stärke der Pyro-Schicht ca. 3 µm),

3) RWO 452-PyC überdreht = nachträgliche Entfernung der Pyro-Schicht von den Kontaktflächen,

4) 'high-density'-Graphit pyrolysiert, RWO 452-1-PyC (gegenüber Standardgraphit um den Faktor 1.3 höherer spezifischer Widerstand Material feinkörnig, geringer Abrieb)

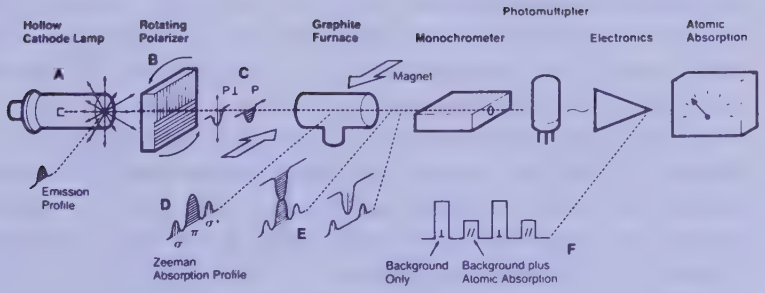


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines elektrothermalen Zeeman-Atomabsorptionsspektrometers mit angelegtem Mangnetfeld im Bereich des Probenraumes.

Das Aufbringen einer pyrolytischen Schicht auf den Basisgraphit erfolgt in einer Methan/Argon-Atmosphäre (10) nach einem speziellen Temperatur/Zeit-Programm und führt zu einer dichteren Packung des Graphitgefüges an der Küvettenoberfläche. Dadurch werden Diffusionsprozesse von flüssigem und dampfförmigem Probenmaterial in den Bereich der Küvettenwandung reduziert. Darüberhinaus vermindert eine pyrolytische Beschichtung bei hohen Temperaturen die Bildung von schwerflüchtigen Metallcarbiden (11-13); diese Tatsache hat besondere Bedeutung bei der Bestimmung sog. 'refraktärer Metalle' wie Ti, V, Cr, wo Atomisierungstemperaturen von >2300°C erforderlich sind.

Zur Auswahl geeigneter Küvetten wurde ihr Temperaturverlauf in Abhängigkeit vom Heizstrom mit Hilfe eines Glühfaden-Farb-Mikropyrometers der Fa. Keller/Ibbenbüren bestimmt. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 650 und 550 nm (Vorsatzfilter) unter Verwendung einer Vorsatzlinse des Typs D (Vergrößerung 33-fach); der Meßabstand betrug 25 cm.

Zur Ermittlung der Farbtemperatur $T_c = 99 \Big/ \left(\frac{650}{Tgrün} - \frac{550}{Trot} \right)$ K diente

ein Nomogramm; es erfolgte Umrechnung von K in °C. Der Meßbereich der Apparatur lag zwischen 650 und 3500°C. Wiederholte Messungen (n = 6) bei 1000°C ergaben eine Standardabweichung s = + 0.9°C, bei 1500°C betrug s = + 2.8°C und bei 2000°C + 3.2°C.
Abb. 6 zeigt den Temperaturverlauf bei den einzelnen Küvetten in Abhängigkeit vom Atomisierungsstrom, wobei besonders im Bereich niedriger Stromstärken erhebliche Temperaturdifferenzen auftreten. Als Meßzone diente jeweils das untere Drittel des Probenraumes, da die Temperatur an der Innenwand aufgrund der Küvettengeometrie nicht konstant ist und sich das Probenmaterial bei der Analyse in diesem Bereich befindet. Es ergab sich unabhängig vom verwendeten Material bei maximalem Stromfluß von 310 A ein durchschnittliches Temperaturgefälle von 400°C vom Bereich der Injektionsöffnung bis zur Probenraumbasis.

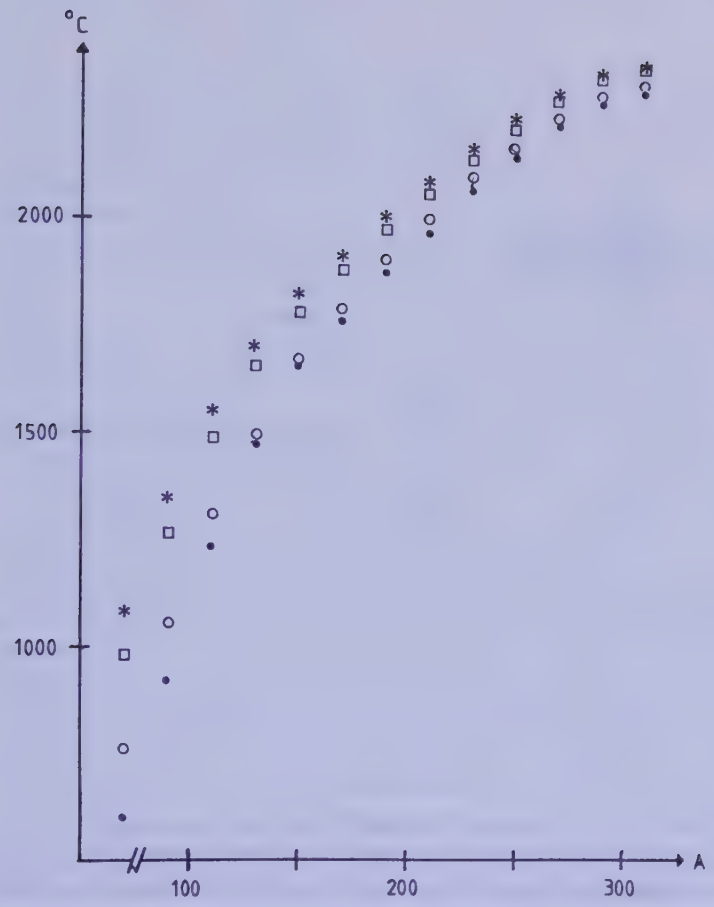


Abb. 6: Bestimmung der Küvettentemperatur mit Hilfe eines Glühfaden-Farb-Mikropyrometers

* —	Küvette	RWO - 452/1 - PyC ('high density' graphite)
□ —	"	RWO - 452/PyC (standard graphite)
○ —	"	RWO - 452/PyC - überdreht
• —	"	RWO - 452

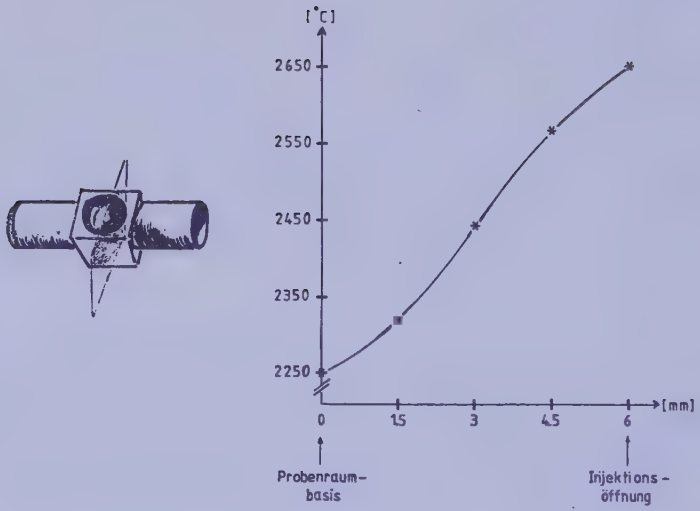


Abb. 7: 'cup-type'-Küvette und Temperaturprofil im Bereich des Probenraumes

3.1.2.3. Analytik von Chrom und Cadmium mit Hilfe der ZFAAS

Eine Direktbestimmung von Cr und Cd nach Verdünnung des Serums um den Faktor zwei bis vier besitzt zwar den Vorteil einer geringeren Kontaminationsgefahr, doch ist der Meßvorgang mit der AAS problematisch, da die Metallkonzentrationen im Serum häufig nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze der Methode liegen. Darüberhinaus führt ein Aufschäumen des Probenmaterials, das man bei Verwendung von verdünntem Nativserum während der Trocknungsphase regelmäßig beobachtet, zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen; zusätzlich erschweren unspezifische Rauchsignale, hervorgerufen durch Streuabsorption, die Identifizierung des spezifischen Signals. Eine separate Probenaufarbeitung mit Zerstörung der organischen Matrix ist daher unumgänglich. Ein brauchbares Verfahren stellt die Veraschung mit angeregtem Sauerstoff dar.

3.1.2.3.1. Probenaufarbeitung mit Hilfe der Tieftemperaturveraschung im Sauerstoff-Plasma

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Oxidation von organischen Probenbestandteilen in einer O_2-Atomsphäre, wobei der Sauerstoff einem Hochfrequenzfeld von 13.5 Mhz ausgesetzt wird. Da neben molekularem O_2 hierbei auch O_2*, atomarer Sauerstoff O, Sauerstoffionen O^+, Ozon und Elektronen entstehen, resultiert ein hohes Oxidationspotential und somit ein Aufschluß bei relativ niedriger Temperatur von 180 - 240°C an der Probenoberfläche. Die in den Reaktionskammern entstehende Temperatur ist eine Folge des exothermen Oxidationsvorganges und substanzabhängig. Die gasförmigen Reaktionsprodukte, im wesentlichen CO_2, NO_2, SO_2 werden mit Hilfe einer Vakuumpumpe unter Gasballast abgesaugt (68). Eine vorgeschaltete Gefriertrocknung ist bei flüssigen Materialien unumgänglich. Als Apparatur stand ein Tieftemperatur-Plasma-Verascher der Fa. DIONEX/IPC Mod. 4005-248ANA sowie eine Vakuumpumpe Leybold/Heraeus (Leistung 450 l/min) mit einer zwischengeschalteten Kühlfalle zur Verfügung. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:
Glasgefäße N 20-5 aus Duran mit Schnappverschluß und Tefloneinsatz (Fa. Macherey/Nagel, Düren), Fassungsvermögen 5 ml, wurden zunächst 30 min in 15% HNO_3 ausgekocht, anschließend 3 x mit destilliertem Wasser nachgewaschen und 4 x nacheinander mit bidestilliertem Wasser ausgespült; Schnappverschlüsse und Teflonsepten wurden 12 Stdn. mit 'EXTRAN-alkalisch' (Fa. Merck) behandelt und ebenfalls mehrfach mit Aqua dest. bzw. bidest. gespült. Die Trocknung von Gefäßen und Verschlüssen erfolgte über 36 Stdn. bei 45°C in einer mit hartem Filterpapier abgedeckten Glasschale. Nach stichprobenartiger Kontaminationsprüfung der Gefäße mit 0.5 ml 0.1 M HCl Suprapur (Einwirkzeit ca. 30 min) wurden je 2.0 ml Serum und 1.0 ml H_2O bidest. eingefüllt und dieser Ansatz bei -30°C in verschlossenen Boxen etwa 12 Stdn. tiefgefroren. Der relative Pipettierfehler der benutzten 500 µl-Pipetten der Fa. Eppendorff lag unter 0.5%. Anschließend erfolgte Überführung der Proben in die Reaktionskammern der Veraschungsapparatur und Gefriertrocknung bei 2.5 Torr über die folgenden 12 Stdn. Durch Verdünnung des Serums entsteht bei der Gefriertrocknung ein schwammartiger Rückstand mit großer Oberfläche, so daß das O_2-Plasma gut bis zum Gefäßboden einwirken kann.

Die nun erfolgende Veraschung wurde bei einem O_2-Durchfluß von 400 ml/min und einer Generatorleistung von 270 W vorgenommen. Durch Zumischung von Argon (pAr = 1.5 Torr) war eine Erhöhung des O_2-Partialdrucks um 0.5 Torr möglich, ohne daß das Plasma instabil wurde. Nach ca. 18 Std. war die Veraschung von 32 Proben = 64 ml Serum vollständig, wobei eine weiße Substanz übrigblieb. Der rel. Gewichtsverlust der gefriergetrockneten Seren betrug nach dem Aufschluß im Mittel 84%. Das Mineralisat löste sich glatt in 500 µl 0.2 M HCl Suprapur, wobei leichtes Aufschäumen auf vorhandene Carbonate und evtl. Peroxide schließen läßt.

Die vollständige Zerstörung der organischen Matrix wurde mit Hilfe des Aminosäuren-Analysators Autolab-System-AA der Fa. Biotronic nachgewiesen; die Säulenfüllung bestand aus DC-4A-Dionex-Chromat-Harz. Der vorhandene Peak im aufgeschlossenen Serum bei einer Retentionszeit von 135 min zeigt NH_3 bzw. NH_4-Salze an (Abb. 8).

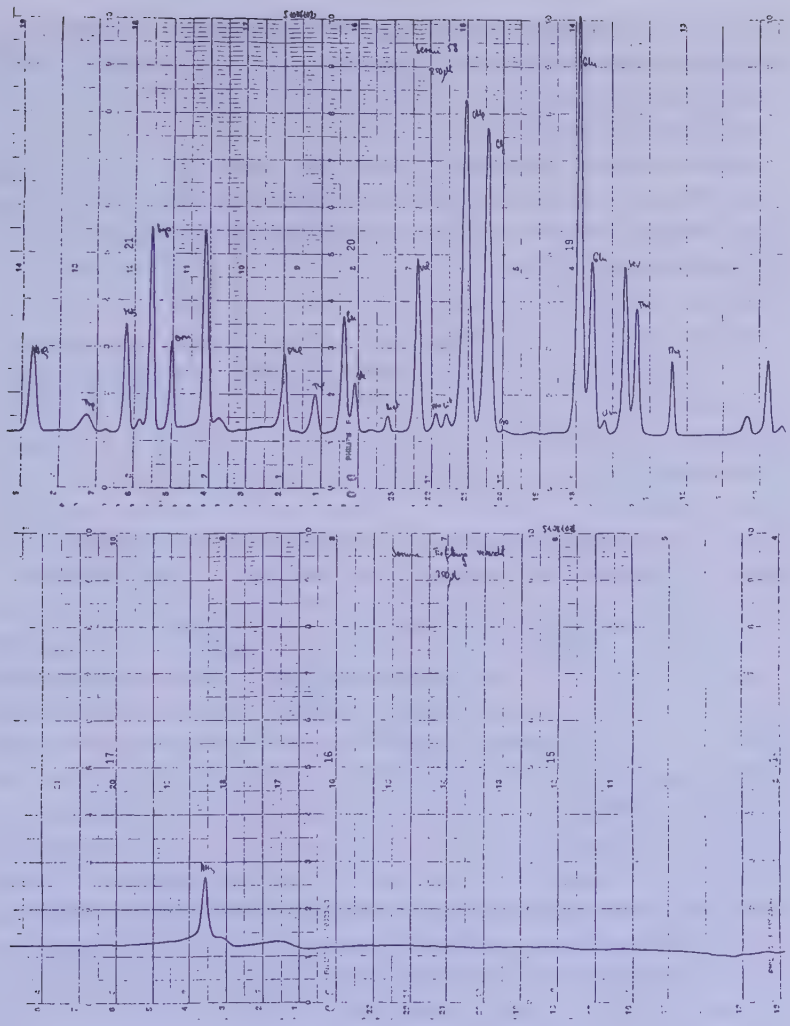


Abb. 8: Nachweis der Zerstörung von organischer Matrix im Serum; Aminosäurenanalyse vor (oben) und nach Veraschung im angeregten Sauerstoffplasma

3.1.2.3.2. Das Verfahren der Internen Standardaddition

Obwohl die Standardadditionsmethode zur Ermittlung der unbekannten Metallkonzentrationen relativ aufwendig ist, wurde diese Methode gewählt, um Matrixeffekte und Einflüsse des Küvettenmaterials auf die Analyse möglichst auszuschalten.
Hierbei wurde das Serum jeweils dreimal mit einer definierten Menge des zu bestimmenden Metalls aufgestockt, die Einzelwerte vermessen und mit Hilfe der linearen Regression y = ax + b der Abszissenabschnitt errechnet (Abb.9).

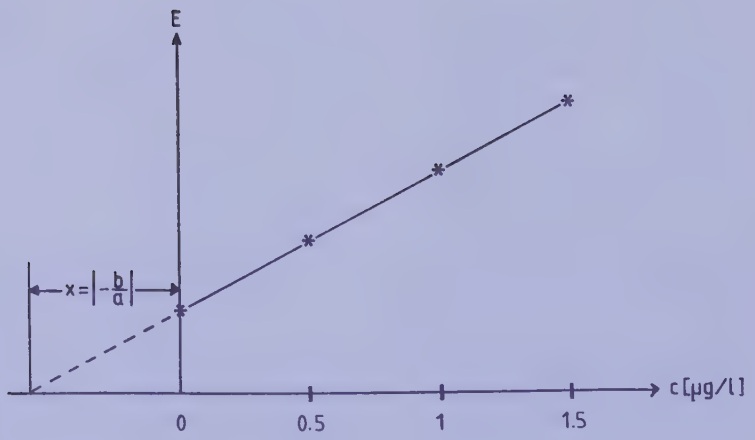


Abb. 9: Grafische Darstellung des Standardadditionsverfahrens zur Ermittlung einer unbekannten Analytkonzentration x aus der Regressionsgeraden y = ax + b

3.1.2.3.3. Bestimmung von Chrom

Chrom erfordert als refraktäres Metall besonders bei niedrigen Konzentrationen hohe Atomisierungsenergien, um auswertbare Signale zu erhalten; daher wurde grundsätzlich mit dem maximalen Atomisierungsstrom der Apparatur von 310 A gearbeitet. Die dadurch bedingten hohen Küvettentemperaturen führen zu einer enormen Beanspruchung des Graphitmaterials und damit zu einem hohen Küvettenverschleiß.
Wie Abb. 10 zeigt, weisen pyrolytisch beschichtete Küvetten aus Standardgraphit eine geringere Empfindlichkeit auf als entsprechende Küvetten aus 'high-density'-Graphit. Dieser Unterschied macht sich gleichermaßen bei der Messung wäßriger Standards wie von Serumproben (ttv-verascht) bemerkbar. Daher wurden für die Chromanalytik ausschließlich Küvetten des Typs RWO 452/1 PyC verwendet.
In Tabelle 1 sind die bei der Vergleichsmessung registrierten Temperaturen während der Atomisierungsphase gegenübergestellt. Zur stufenlosen Temperaturmessung diente ein Si-Fotoelement als IR-Detektor (Infratherm IS 2, Fa. Gulton); die Registrierung erfolgte über einen Bereich von 1100 - 3000°C; der Meßfleck wurde auf den Boden des cup-Bereichs der Küvette ausgerichtet. Neben der Empfindlichkeitssteigerung bei Verwendung des 'high-density'-Graphits um den Faktor zwei im Vergleich zu Standardgraphit ist ferner bemerkenswert, daß der Atomisierungsprozeß von Cr^{6+} in aufgeschlossenen Serumproben bei einer 400°C niedrigeren Temperatur einsetzt. Außerdem besteht eine Temperaturdifferenz zwischen der maximalen spezifischen und der Untergrundabsorption von knapp 1000°C gegenüber 500°C bei Standardgraphit; bei etwa gleichem Temperatur/Zeit-Profil beider Küvetten resultiert hieraus eine bessere zeitliche Trennung von Meß- und Untergrundsignal (peak separation); sie beträgt 3 sec für 'high-density'-Graphit und 1.8 sec für Standardgraphit. Diese Fakten zeigen, daß der Oberflächenstruktur des Graphits eine entscheidende Bedeutung bei der Bestimmung refraktärer Metalle wie Chrom zukommt. Die untere Nachweisgrenze für Cr^{6+} (Signal/Rausch-Verhältnis = 2 : 1) im Fall wäßriger Standardlösungen betrug $6 \cdot 10^{-12}$ g bei einem Injektionsvolumen von 30 µl; der Extinktionsverlauf als Funktion der Konzentration ist linear (Abb. 11).

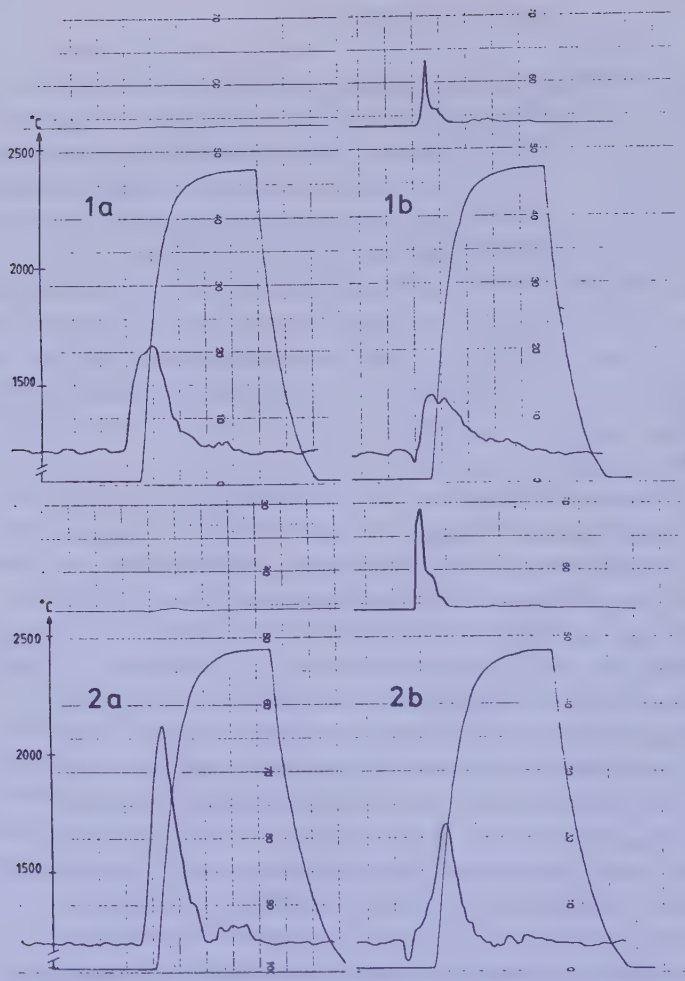


Abb. 10: Vergleich von Cr^{6+}-Messungen bei Verwendung pyrolytisch beschichteter Küvetten aus (1) Standardgraphit (RWO 452 PyC) und (2) 'high-density'-Graphit (RWO 452/1 PyC);
a) wäßriger Cr^{6+}-Standard, Konz. 4 µg/l
b) ttv-Serum + wäßriger Cr^{6+}-Standard, Konz. 3 µg/l, im Verhältnis 1 : 1; Pipettiervolumen 30 µl
Simultanregistrierung der Küvettentemperatur sowie spez. und nicht spez. Extinktion während der Atomisierungsphase; Papiervorschub 5 mm/s

	wäßriger Cr^{6+}-Standard		Cr^{6+} in ttv-Serum	
	RWO 452PyC	RWO 452/1PyC	RWO 452PyC	RWO 452/1Pyc
Beginn der spez. Extinktion	1700°C	1715°C	1810°C	1415°C
Beginn der nichtspez. Extinktion	-	-	1300	1095
Maximum der spez. Extinktion	2305	2265	2250	2275
Maximum der nichtspez. Extinktion	-	-	1750	1300
Ende der spez. Extinktion	2410	2430	2415	2415
Ende der nichtspez. Extinktion	-	-	2215	2107

Tabelle 1: Temperaturvergleich während der Atomisierungsphase zwischen Cr^{6+} als wäßrigem Standard (4 µg/l) und in veraschter organischer Matrix (ttv-Serum + 3 µg/l Cr^{6+} 1 : 1); Gegenüberstellung der Küvetten RWO 452 PyC (Standardgraphit) und RWO 452/1PyC ('high-density'-Graphit)

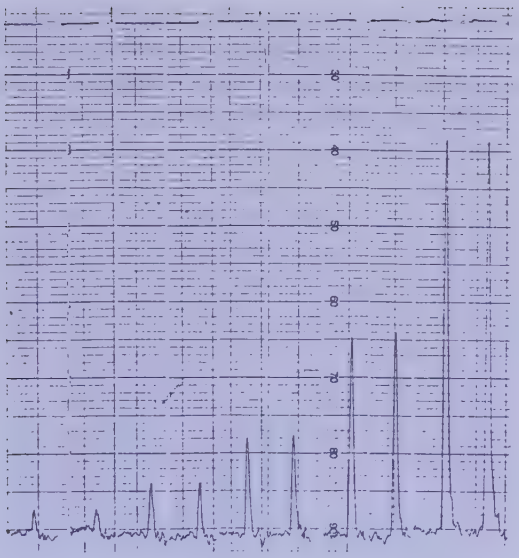
Zur Bestimmung der Serumkonzentrationen wurde das Veraschungsprodukt aus 2 ml Serum im Aufschlußgefäß mit 100 µl 1 M HCl Suprapur versetzt und mit Aqua bidest. auf 500 µl aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung wurde in Polystyrolröhrchen (Fa. Sarstedt) folgender Bestimmungsansatz erstellt:

Gefäß Nr.		1	2	3	4
Probenstammlösung	µl	50	50	50	50
Aqua bidest.	µl	150	100	50	-
Cr^{6+}-Standard (2 µg/l)	µl	-	50	100	150

Die Cr-Standardlösung wurde aus $K_2Cr_2O_7$-Urtitersubstanz 'Merck' hergestellt und mußte etwa alle 7 Tage neu angesetzt werden, da nach dieser Zeit trotz Aufbewahrung der Lösung in Polystyrolröhrchen bei +5°C schon Konzentrationsverluste von durchschnittlich 5% nachweisbar waren. Duran-Glasgefäße sind zur Aufbewahrung wäßriger Cr^{6+}-Standards infolge Austausch mit der Glasoberfläche ungeeignet (31).
Die Messung der Einzelwerte erfolgte unmittelbar nach Erstellung des Bestimmungsansatzes bei folgenden Geräteparametern:

Trocknung	:	ramp-mode 1 A/s bis 10 A, danach 0.05 A/s bis zur Probentrocknung
Zersetzung	:	60 A/60 s; carrier-gas-flow 100 ml/min Ar
Atomisierung	:	310 A/7.5 s; carrier-gas-flow 25 ml/min
sheath-gas	:	4 l/min Ar
Lampenstrom	:	15 mA (Cr-HKL, Fa. Varian-Techtron)
Spalt	:	0.5 nm
Skalendehnung	:	4-fach; Extinktion 0.2 bei Vollausschlag
Ansprechzeit des Signals	:	Stufe 2
Schreiber-Eingang	:	2 mV spez. Signal / 20 mV unspez. Signal
Papiervorschub	:	5 cm/min
Pipettiervolumen	:	30 µl (Pipettierfehler < 0.5 %)

Als Erregerlinie diente der Obergang $^7S_3 \longrightarrow {}^7P_3$ bei 359.3 nm. Auf die Optimierung der Geräteparameter sei nicht eingegangen.



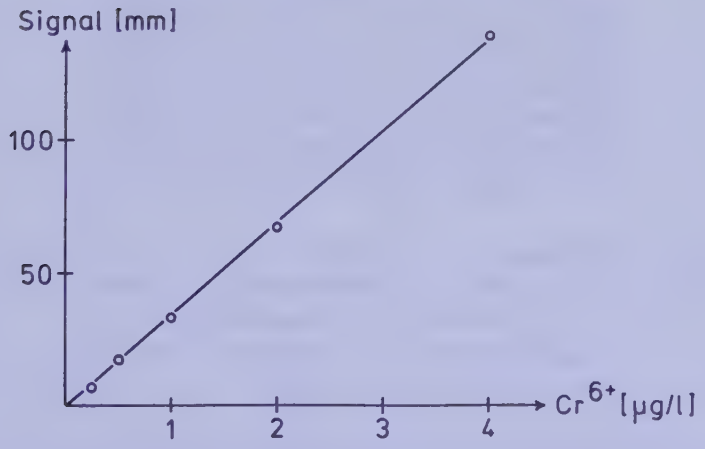


Abb. 11: Messung wäßriger Cr^{6+}-Standards zum Nachweis eines linearen Extinktionsverlaufs

Jeder Einzelwert eines Probenansatzes wurde doppelt vermessen, und die Regressionsgerade aus acht Wertepaaren errechnet. Abb. 12 zeigt die verkleinerte Originalregistrierung von Chrom in einer aufgeschlossenen Serumprobe. Die Konzentration beträgt hier 0.18 µg/l.

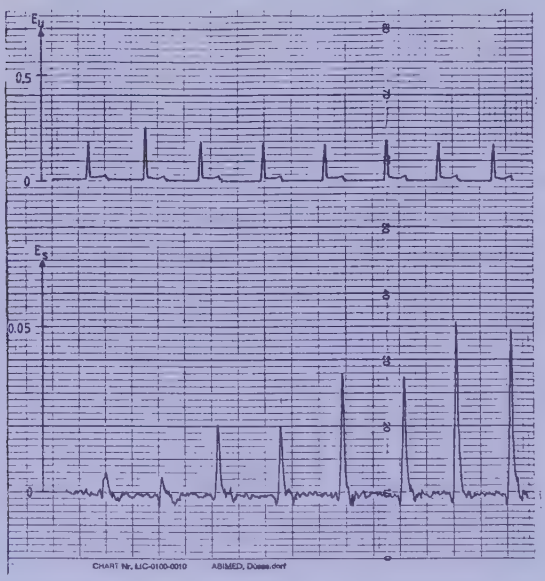


Abb. 12: Originalregistrierung von Chrom in einer ttv-Serumprobe; Aufstockung der 50 µl Probenstammlösung um jeweils 50 µl Cr^{6+}-Standard 2 µg/l, Pipettiervolumen 30 µl
E_s = spez. Extinktion; E_u = Extinktion Untergrund

In der Regel beobachtet man bei der Bestimmung von Metallen in einer komplexen Matrix eine Extinktionsabnahme im Vergleich zu wäßrigen Standardlösungen. Bei Chrom hingegen wurde durchweg eine Zunahme der Extinktion von durchschnittlich 25% bez. auf wäßrige Standardlösungen registriert. Dieses Phänomen der Empfindlichkeitssteigerung könnte auf eine höhere Flüchtigkeit des Chromcarbids bei Anwesenheit anderer

refraktärer Metall wie z.B. Al zurückgeführt werden (32); eine völlige Unterdrückung der Carbidbildung läßt sich auch bei Einsatz von pyrolytischem Graphit nicht erreichen.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Konzentrationsmessungen wurden fünf Serumproben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt; gleichzeitig wurde das Signal eines wäßrigen Cr^{6+}-Standards 1.5 µg/l registriert, um die oben beschriebene Empfindlichkeitssteigerung zu dokumentieren. Pro Doppelbestimmung wurde jeweils eine neue Küvette eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengefaßt:

Probe	Küvette	Steigung der Regressionsgeraden	Empfindlichkeits-steigerung	Konz.µg/l
A	1	0.443	22.1 %	0.248
A	1	0.460	25.8 %	0.241
B	2	0.467	25.6 %	0.414
B	2	0.490	30.4 %	0.391
C	3	0.480	23.4 %	0.193
C	3	0.561	35.2 %	0.199
D	4	0.582	35.4 %	0.233
D	4	0.451	17.0 %	0.213
E	5	0.485	23.1 %	0.378
E	5	0.477	23.3 %	0.395

Tabelle 2: Reproduzierbarkeit von Cr-Messungen in Serumproben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen

Es ergibt sich eine mittlere relative Abweichung der gemessenen Konzentrationen von 5% bei zwei Bestimmungen im zeitlichen Abstand von 24 Stunden. Die obigen Daten zeigen ferner, daß aufgrund unterschiedlicher Geradensteigungen, sogar bei Verwendung derselben Küvette, eine interne Standardaddition unumgänglich ist. Die Lebensdauer der verwendeten RWO 452/1PyC-Küvetten war im Mittel auf 30 Einzelmessungen begrenzt, so daß maximal vier Serumproben mit einer Küvette bestimmt werden konnten. Der lineare Korrelationskoeffizient für E = f(c) lag bei acht Meßwerten im Bereich $1 > r > 0.99$, die mittlere rel. Abweichung der Einzelmessungen innerhalb eines Bestimmungsansatzes war durchweg kleiner als 7%.

3.1.2.3.4. Bestimmung von Cadmium

Zur Messung des Cadmium wurde das Veraschungsprodukt aus 1 ml Serum in 50 µl 1M HCL aufgenommen und mit bidestilliertem Wasser auf 500 µl verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde in Polystyrolröhrchen folgender Probenansatz erstellt:

Gefäß Nr.		1	2	3	4
Stammlösung	µl	50	50	50	50
Aqua bidest.	µl	150	100	50	-
Cd-Standard (0.6 µg/l)	µl	-	50	100	150

Sämtliche Bestimmungen erfolgten in pyrolytisch beschichteten Küvetten des Typs RWO 452 PyC, deren Kontaktflächen wegen besserer Reproduzierbarkeit unbeschichtet (überdreht) waren. Auch bei Cd-Messungen zeigte sich eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber unbehandeltem Graphit um den Faktor 1.3 - 1.5.

Die Registrierung wurde bei folgender Geräteeinstellung vorgenommen:

Trocknung	:	ramp-mode 1 A/s bis 14 A, danach 0.05 A/s bis zur Probentrocknung
Zersetzung	:	40 A/30 s
Atomisierung	:	140 A/7.5 s
carrier-gas	:	20 ml/min Ar während des Gesamtdurchlaufs
sheath-gas	:	4 l/min Ar
Lampenstrom	:	12.5 mA (Cd-HKL, Fa. Varian-Techtron)
Spalt	:	0.5 nm
Skalendehnung	:	2.5-fach, Extinktion 0.25 bei Vollausschlag
Ansprechzeit des Signals	:	Stufe 1
Schreiber-Eingang	:	5 mV spez. Signal / 100 mV unspez. Signal
Papiervorschub	:	5 cm/min
Pipettiervolumen	:	30 µl

Als Erregerlinie diente der Übergang $^1P_1 \rightarrow {}^1S_0$ bei 228.8 nm.

Der Optimierung der Geräteparameter kommt bei der Cd-Messung wesentliche Bedeutung zu, da beispielsweise schon eine geringfügig zu hohe Zersetzungstemperatur und carrier-gas-flow zu merklichen Elementverlusten führen (25). Schwer flüchtige Matrixbestandteile lassen sich im Zersetzungsschritt kaum eliminieren; deshalb ist es notwendig, durch geeignete Wahl der Atomisierungstemperatur eine möglichst große zeitliche Trennung zwischen spezifischer und Untergrundextinktion zu erreichen; zu hohe Atomisierungstemperaturen (>1800°C) führen zu einer deutlichen Intensitätsminderung des spez. Signals und schließlich zum Auftreten biphasischer Absorptionen (Peakschultern) aufgrund unzureichender peak-separation. Die Abhängigkeit der peak-separation vom Atomisierungsstrom ist zusammen mit der relativen Intensität des spez. Signals bezogen auf das Extinktionsmaximum bei 140 A in Abb. 13 dargestellt. Neben der Registrierung von spez. und Untergrundextinktion zeigt Abb. 14 den Temperaturverlauf während der Atomisierungsphase im cup-Bereich einer überdrehten Küvette RWO 452 PyC für eine mit Cd aufgestockte Serumprobe; der Stromfluß beträgt 150 A; die entsprechenden Temperaturdaten sind auf der gleichen Seite aufgelistet.

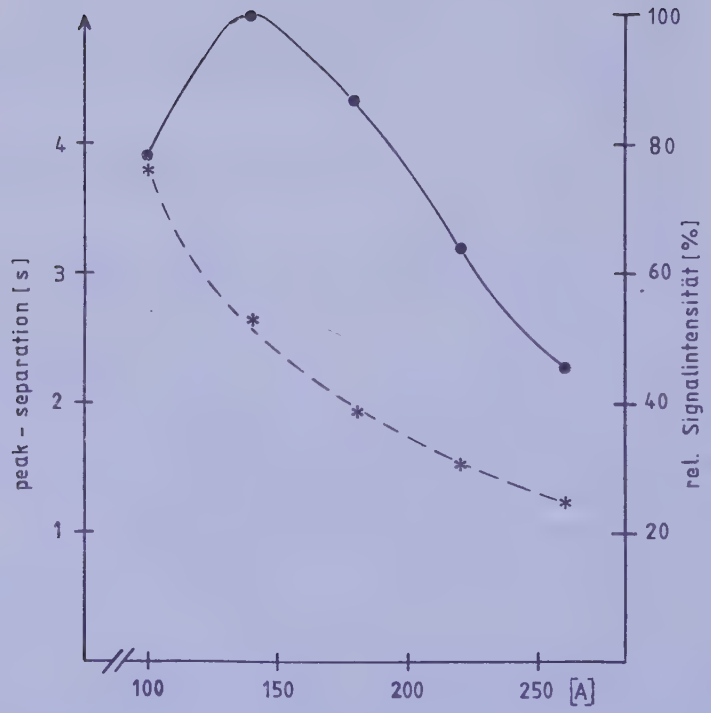


Abb. 13: Cd Bestimmung im Serum :
peak-separation in sec (*) und rel. Signalintensität (●) als Funktion des Atomisierungsstroms

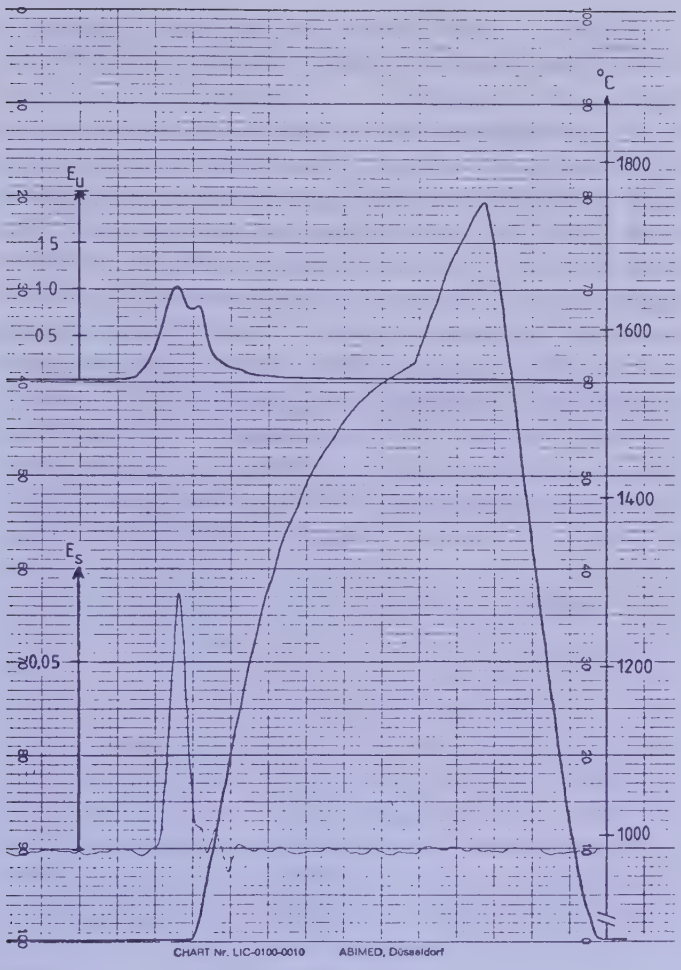


Abb. 14: Cd-Bestimmung im Serum :

Temperaturverlauf während der Atomisierungsphase;
Küvette: RWO 452 PyC überdreht;
E_s = spez. Extinktion; E_u = Untergrundextinktion

Beginn der spez. Extinktion	825° C
Maximum der spez. Extinktion	951° C
Ende der spez. Extinktion	1044° C
Beginn der Untergrundextinktion	888° C
Maximum der Untergrundextinktion	1110° C
Ende der Untergrundextinktion	1496° C

Die Verdampfung der Matrix erfolgt hier über einen Temperaturbereich von etwa 600°C, während sich die Atomisierung des Cd lediglich über einen Bereich von 220°C erstreckt.
Abb. 15 zeigt die Originalregistrierung von Cd in einer ttv-Serumprobe nach dem Standardadditionsverfahren. Die gleichzeitige Dokumentation des spezifischen und unspezifischen Signals bei einer Schreibergeschwindigkeit von 5mm/s macht die peak-separation deutlich, wobei die unspezifische Extinktion im Maximum des Atomabsorptionssignals lediglich den Wert 0.05 besitzt. Darüberhinaus zeigt sich, daß auch bei Verwendung des Zeeman-Effektes eine unspezifische Extinktion von etwa 1.0 nur unvollständig kompensiert werden kann, ersichtlich an dem jeder Registrierung nachfolgenden kleinen Peak. Die Nachweisgrenze von wäßrigen $CdCl_2$-Standards betrug $7.5 \cdot 10^{-13}$ g Cd; vom Hersteller werden $3 \cdot 10^{-13}$ g angegeben (74). Die Reproduzierbarkeit der Konzentrationsmessungen wurde mit Hilfe von fünf Serumproben und dem Einsatz von zwei Küvetten ermittelt, wobei eine gegebene Probe im zeitlichen Abstand von 24 Stunden mit Küvette 1 und 2 gemessen wurde (Tab. 3):

Probe	Küvette	Steigung der Regressionsgeraden	Konz. µg/l
A	1	0.655	0.381
A	2	0.635	0.365
B	1	0.644	0.336
B	2	0.623	0.352
C	1	0.657	0.460
C	2	0.629	0.468
D	1	0.667	0.270
D	2	0.643	0.285
E	1	0.624	0.163
E	2	0.601	0.145

Tabelle 3: Reproduzierbarkeit von Cd-Messungen in Serumproben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen

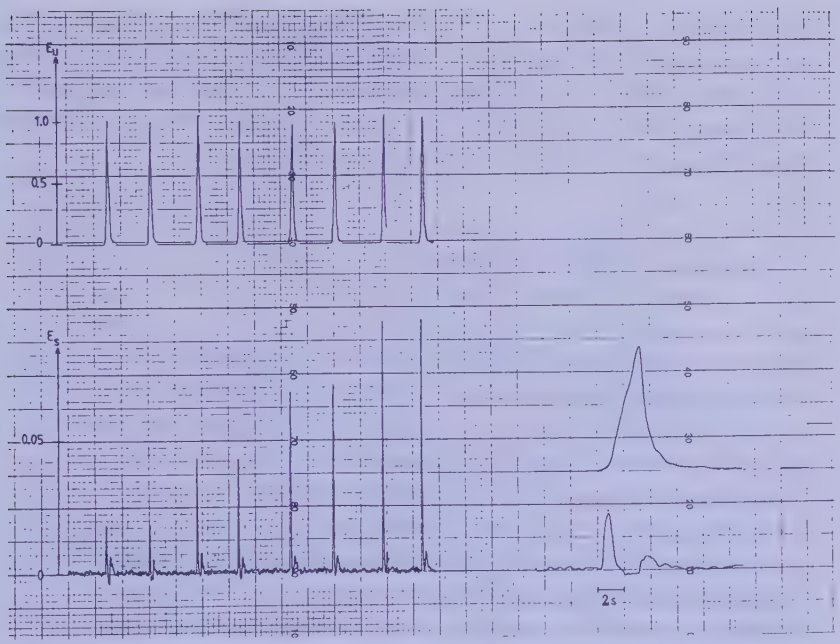


Abb. 15: Originalregistrierung von Cd in einer ttv-Serumprobe; Aufstockung der 50 µl Probenstammlösung mit jeweils 50 µl Cd^{2+}-Standard 0.6 µg/l

Die mittlere Abweichung der gemessenen Konzentrationen betrug 5,5% bezogen auf $\bar{x}$. Die unterschiedliche Steigung der Regressionsgeraden, bedingt durch differente Zusammensetzung der Probenmatrix als auch durch Unterschiede der Küvetten, zeigt die Notwendigkeit des Standardadditionsverfahrens. Im Gegensatz zu Chrom nimmt die Intensität des Cd-Signals bei der Registrierung von ttv-Serumproben im Vergleich mit wäßrigen Standards leicht ab.

3.2. Referenzmethoden

Zur Erfassung systematischer Fehler der Meßmethode, wurden einzelne Seren stichprobenartig mit unabhängigen Verfahren bestimmt. Im Fall der Cr-Analytik wurde die Neutronenaktivierungsanalyse, bei Cd die Inversvoltammetrie als elektrochemisches Verfahren eingesetzt. Angesichts der hohen Zn-Konzentrationen im Serum wurde auf Referenzmessungen verzichtet.

3.2.1. Prinzip der Inversvoltammetrie (anodic stripping voltammetrie, ASV)

Die ASV ist ein polarographisches Verfahren, bei dem an einer Arbeitselektrode unter konstantem Potential Metallionen zunächst kathodisch reduziert und abgeschieden werden, deren Potential bzgl. der Reaktion $Me^{n+} + ne \longrightarrow Me$ gemäß der Spannungsreihe bei positiveren Werten liegt als die angelegte Spannung. Wird anschließend das Potential der Arbeitselektrode in anodischer Richtung geändert, löst sich das Metall von der Elektrode infolge Reoxidation ab und verursacht im Meßkreis einen der abgeschiedenen Menge proportionalen Stromfluß (Abb. 16) (20).
Der Vorteil der Methode besteht darin, daß beim Durchlauf eines vorgegebenen Spannungsbereichs ΔU (potential-sweep) die abgeschiedenen Metalle ihrem Potential entsprechend oxidiert werden und somit mehrere Komponenten in einem Arbeitsgang bestimmbar sind; darüberhinaus wird die Probe während der Analyse nicht verändert und steht für weitere Messungen zur Verfügung. Nachteilig wirkt sich die im Vergleich zur AAS wesentlich längere Zeit für eine Einzelmessung aus.

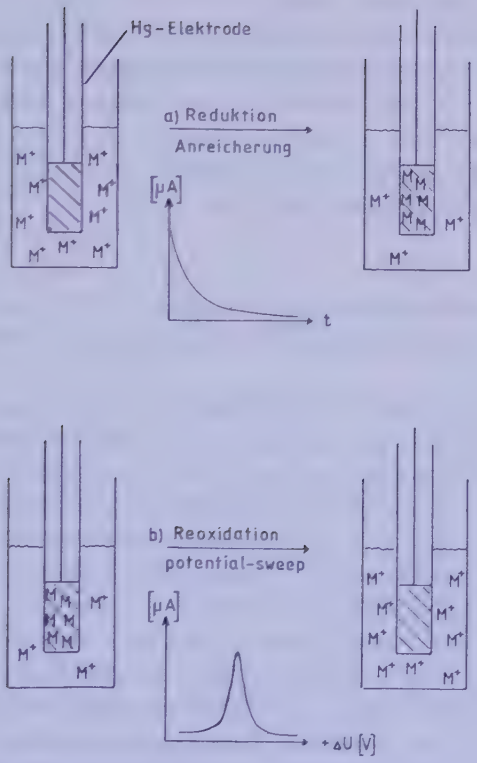


Abb. 16: Prinzip der Inversvoltammetrie mit der stationären Quecksilberfilmelektrode:

a) Reduktion der Metallionen und Anreicherung als Amalgam bei konstantem Potential

b) Reoxidation durch potential-sweep in anodischer Richtung und Registrierung des der abgeschiedenen Menge proportionalen Stromflusses

3.2.1.1. Notwendige Probenaufarbeitung

Für polarographische Metallbestimmungen ist eine vollständige Zerstörung der biologischen Matrix nötig.
Einerseits behindern organische Substanzen durch Adsorption die Metallabscheidung sowie die Reoxidation an der Arbeitselektrode und erschweren andererseits durch H_2-Entwicklung (herabgesetzte Wasserstoffüberspannung) die Identifizierung des Cadmium-Signals (24). Daher wurden die Serumproben analog zu den AAS-Messungen im angeregten Sauerstoffplasma vorbehandelt und somit die biologische Matrix zerstört.

3.2.1.2. Vergleichsmessungen von Cadmium mit Hilfe der DPASV unter Verwendung einer rotierenden Quecksilberfilmelektrode

Im Vergleich mit HMD-Elektroden (hanging mercury drop) besitzen rotierende Glas/Kohle-Elektroden, auf die kathodisch ein Hg-Film von 100 - 1000 Å aufgebracht wird (GCMF-Elektrode), eine enorme Empfindlichkeitssteigerung aufgrund der intensiveren Metallanreicherung im kleinen Volumen des Hg-Films. In Verbindung mit der Differentialpuls-Methode wird ihre Leistungsfähigkeit (Nachweis < 1 ppt) gegenwärtig nur von der erreichbaren Kontaminationsfreiheit eingeschränkt (75).
Auf die Theorie elektrochemischer Prozesse und auf den Stofftransport an rotierenden Scheibenelektroden, spez. der GCMF-Elektrode, wird nicht eingegangen und auf nachfolgende Literaturstellen (62-65) verwiesen.
Sämtliche Messungen wurden in Teflon-Gefäßen von 50 ml Fassungsvermögen nach ausreichender O_2-Entgasung (10 min Durchleiten von gereinigtem und getrocknetem N_2) sowie Konditionierung der Meßzelle durchgeführt. Als Arbeitselektrode diente die GC/EA-289 und zur Registrierung nach dem Differentialpulsverfahren der Polarograph E-506 der Fa. Metrohm; als Hilfselektrode fungierte ein Pt-Stab, als Bezugssystem eine Ag/0.1 M KCl/AgCl Elektrode.
Zur Durchführung der Analyse wurde zunächst ein Hg-Film aus einer wäßrigen $2 \cdot 10^{-5}$ M $Hg(NO_3)_2$-Lösung bei -1 V während 5 min auf der GC-Elektrode abgeschieden. Zur Erfassung des Blindwertes wurden 10 µl 30% HCl-Suprapur auf 20 ml H_2O bidest. gegeben und bei unten aufgeführten Bedingungen

vermessen. Bei nicht nachweisbarer Kontamination erfolgte der Zusatz von 300 - 400 µl Lösung des Veraschungsproduktes aus 2 ml Serum in 500 µl 0.2 M HCl mit nachfolgender Anreicherung über 5 - 8 min bei 1500 rpm und -1 V. Der anschließende potential-sweep wurde 30 sec nach Abschalten des Elektrodenmotors in ruhender Lösung unter folgenden Parametern durchgeführt:

U_{Start}	=	-1.0 V
ΔU	=	+1.0 V
UDP	=	-50 mV
mm/t_{drop} (Papiervorschub)	=	Stufe 0.5
Empfindlichkeit	=	$4\ 10^{-9}$ A/mm
Dämpfung	=	Stufe 1

Bei jeder Serumprobe erfolgte eine dreimalige interne Standardaddition von 400 pg Cd (100 µl einer wäßrigen Cd-Lösung der Konzentration 4 µg/l). Der Hg-Film wurde während eines gesamten Arbeitsganges (ca. 3 Serumproben) auf der Elektrode belassen, so daß zwischen den Einzelmessungen zusätzliche sweeps zur weitgehenden Entfernung restlichen Cadmiums aus der Hg-Schicht erforderlich waren.

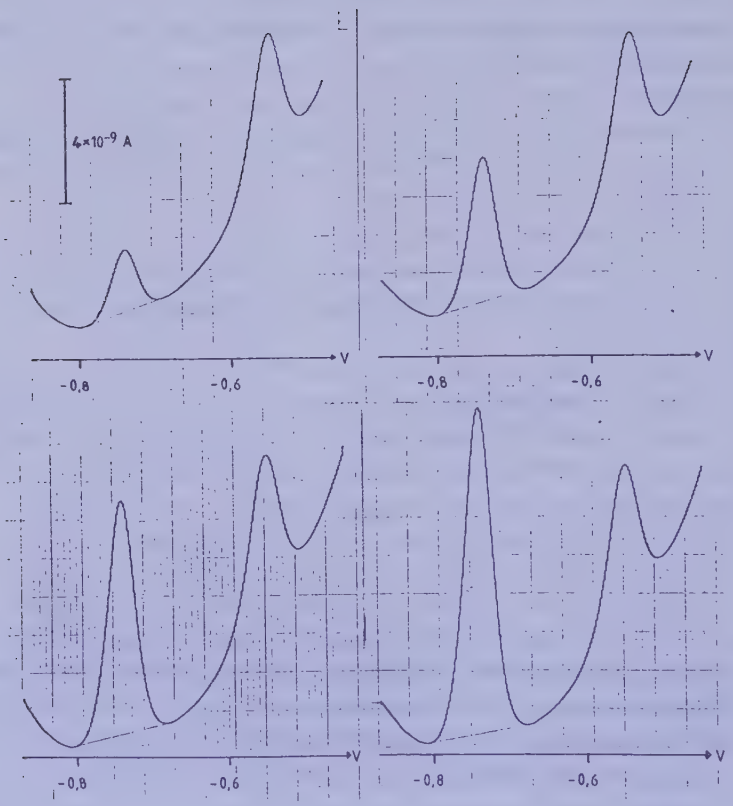


Abb. 17: Cadmium-Bestimmung mit Hilfe der DPASV an der Hg-Film-Elektrode; Originalregistrierung einer im O_2-Plasma veraschten Serumprobe einer Konz. von 0.22 µg/l Cd; interne Standardaddition jeweils 400 pg Cd; das Signal bei -0.55 V zeigt Blei an.

Abb. 17 zeigt die Originalregistrierung einer ttv-Serumprobe mit einem Gehalt von etwa 0.2 µg/l Cd.
Für die entsprechenden AAS-Messungen wurde der verbleibende Rest von 100 - 200 µl Analysat verwendet. Nachfolgende Tabelle 4 zeigt die mit der DPASV-Methode ermittelten Serum-Cd-Werte im Vergleich zu den entsprechenden AAS-Werten, Abb. 18 ihre graphische Gegenüberstellung.

DPASV	AAS	Δ	Δ in % $\bar{x}$
0.088 (µg/l)	0.074 (µg/l)	0.014 (µg/l)	17,3
0.440	0.450	0.010	2,3
0.170	0.150	0.020	12,5
0.230	0.237	0.007	3,0
0.350	0.364	0.014	3,9
0.272	0.274	0.002	7,3
0.222	0.206	0.016	7,5
0.733	0.738	0.005	6,8
0.580	0.540	0.040	7,1
0.762	0.720	0.042	5,7
0.590	0.651	0.061	9,8

Tabelle 4: Vergleichsmessungen von 11 Serumproben mit der DPASV- und der AAS-Methode

Die mittlere Abweichung der Meßwerte beträgt 7.6%.

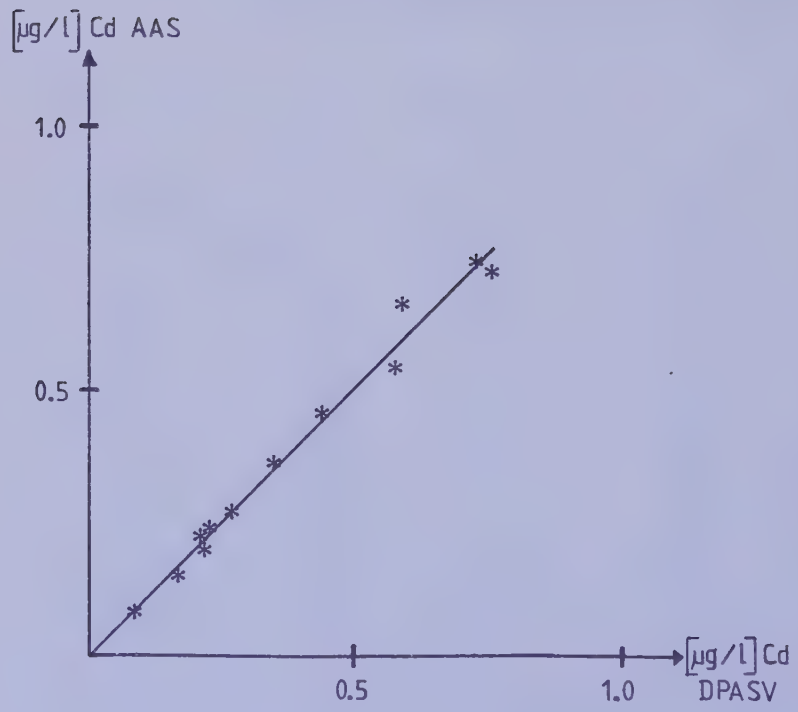


Abb. 18: Graphische Gegenüberstellung von Cadmium-Vergleichsmessungen zwischen AAS und DPASV

$\hat{y} = 1.002x - 0.003$; $r_{xy} = 0.9925$ ($p \leq 0.01$)

3.2.2. Prinzip der Neutronenaktivierungsanalyse (NAA)

Das Prinzip der NAA beruht auf der Umwandlung von Atomkernen, die mit Neutronen oder anderen subatomaren Teilchen (Q_1) beschossen und vom Kern eingefangen werden können; dabei wird ein Quant (Q_2) prompt abgestrahlt. Die Atomkerne der Isotope (B_1), die von den Elementen der Proben stammen, werden dabei in die entsprechenden Radioisotope (R_1) oder andere stabile Isotope wie folgt umgewandelt:

$$B_1 \; (Q_1, Q_2) \; R_1 \xrightarrow[T_H]{S} B_2$$

Die entstandenen Radioisotope zerfallen mit einer charakteristischen Halbwertszeit T_H in einem oder mehreren Schritten wieder in stabile Isotope B_2. Dabei wird in der Regel ß- oder γ-Strahlung emittiert, die gemessen und für die Analyse benutzt werden kann, da ihre Intensität der Anzahl der betreffenden Teilchen proportional ist.
Zur Bestrahlung biologischen Probenmaterials, welches möglichst in getrockneter Form vorliegen muß, eignen sich vor allem niederenergetische, sog. 'thermische' Neutronen mit einer Energie < 0.1 eV, da hierbei die technische Durchführung der Bestrahlung einfacher und der Wirkungsquerschnitt um den Faktor 10^3 größer als bei schnellen Neutronen ist.
Grundsätzlich wird eine simultane Bestimmung möglichst vieler Elemente ohne nachträgliche Trennungsgänge angestrebt, die sog. 'instrumentelle Aktivierungsanalyse'. Treten Störungen von Seiten anderer Elemente auf, so sind physikalisch/chemische Operationen zur Trennung in einzelne Elementgruppen erforderlich; dabei kommen Fällungsmethoden, Säulenchromatographie, Extraktion, Destillation, elektrolytische Abscheidungs- oder Ionenaustauschverfahren in Betracht. Diese Operationen werden jedoch im Anschluß an die Aktivierung durchgeführt, so daß in diesem Arbeitsgang eine Kontamination ausgeschlossen ist.
Zur quantitativen Bestimmung der Elementmengen wird ein Standard benutzt, der die zu analysierenden Elemente enthält und gleichzeitig mit dem

Probenmaterial bestrahlt wird. Nach einer gewissen Abklingzeit erfolgt die Registrierung der γ-Strahlung mit Hilfe von Ge(Li)-Halbleiterdektoren über einen Vielkanal-Impulshöhenanalysator; man erhält so ein γ-Spektrum, wobei auf der Ordinate die Impulszahl und auf der Abszisse die Impulshöhe, d.h. die Quantenenergie dargestellt wird (Abb. 19).

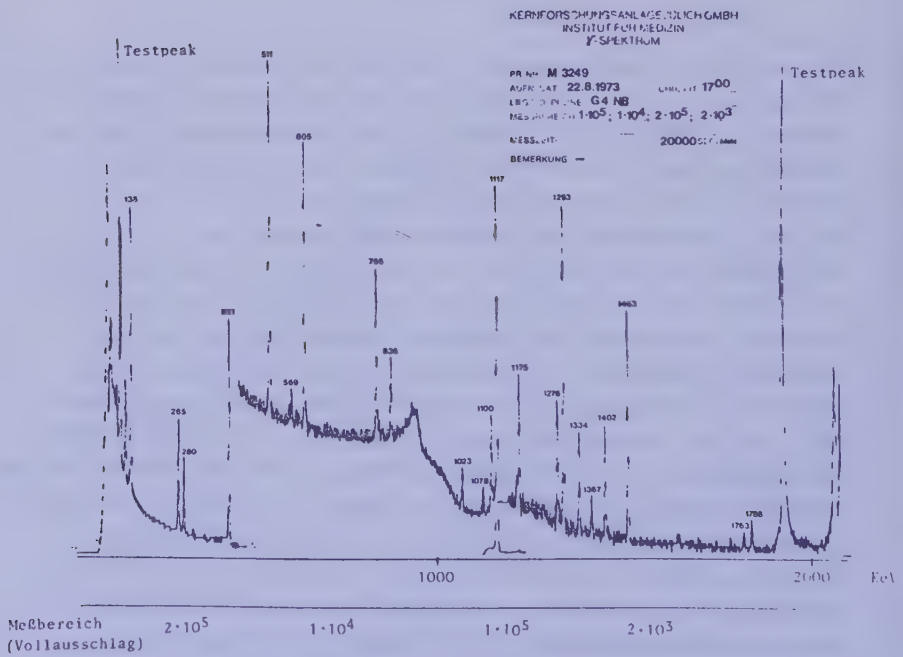


Abb. 19: γ-Spektrum einer Serumprobe nach Neutronenaktivierung

Die im Vielkanal-Impulshöhenanalysator gespeicherten γ-Spektren können auf Magnetbänder übertragen und die Elementkonzentration mit Hilfe eines Standardprogramms von einem Computer ausgerechnet werden; es ist jedoch auch eine Aufnahme direkt im Speicher des Computers möglich, wobei die anschließende Auswertung 'per Hand' vorgenommen wird. Hier besteht der Vorteil, daß es zu keinen Obertragungsschwierigkeiten kommt, die erfahrungsgemäß bei extrem niedrigen Analytkonzentrationen gehäuft auftreten (76).
Die Vorzüge der NAA beruhen auf der praktisch ausgeschlossenen Kontamination nach erfolgter Bestrahlung, der niedrigen Nachweisgrenze und der Möglichkeit der Multielement-Analyse. Von Nachteil sind die hohen instrumentellen Kosten sowie die Voraussetzung spezieller Strahlenlabors und geeigneter Restrahlungsquellen, in der Regel Reaktoren (77).

3.2.3. Restimmung von Chrom mit Hilfe der NAA und Vergleichsmessungen mit der AAS

Durch Einfluß thermischer Neutronen wird das stabile Cr^{50}-Isotop in einem (n,γ)-Prozess in das Radioisotop Cr^{51} umgewandelt, welches durch K-Einfang mit einer Halbwertszeit von 27.8 Tagen in das stabile Vanadinisotop V^{51} zerfällt. Der bei 320 keV auftretende Peak wird für die Konzentrationsbestimmungen verwendet. Aufgrund der niedrigen Cr-Serumkonzentration ist die instrumentelle NAA nicht anwendbar, da das 320 keV-Signal durch den benachbarten Zn-Peak sowie die P^{32}-Bremsstrahlung überlagert wird. Die Reaktion Fe^{54} (n,α) Cr^{51} ist bei Restrahlung mit thermischen Neutronen vernachlässigbar, wenn der Serumeisengehalt 1.5 mg/l nicht wesentlich übersteigt (27).
Infolgedessen wurde das Cr^{51} mittels Ionenaustausch als +3-wertiges Kation in Chelex-Harz-Kolonnen (Bio-Rad Chelex 100 Na^+, 200-400 mesh) komplex gebunden und seine Aktivität direkt in der Säule gemessen. Hierzu ist die Bestimmung eines sog. 'GF-Faktors' (geometry factor) erforderlich, der definiert ist als die Radioaktivität eines 'punktförmig' vermessenen Standards zur entsprechenden Radioaktivität eines definierten Kolonnenbereichs (78). Da bei Anwendung der NAA die Möglichkeit besteht, auch flüssiges Probenmaterial (Nativserum) zu bestimmen, lag es nahe, Einflüsse

der Probenaufarbeitung wie Gefriertrocknung und Tieftemperaturveraschung auf die Cr-Analyse zu erfassen. Aufgrund dieses relativ umfangreichen Versuchsprogramms wurde ein kleines Kollektiv von fünf Probanden verglichen und nachfolgende Bestimmungen durchgeführt :

a) mit der NAA

1. Messung der Nativseren
2. Messung nach Gefriertrocknung
3. Messung nach Gefriertrocknung und Veraschung in Suprasil-Gefäßen
4. Messung nach entsprechendem Probenaufschluß in Duran-Gefäßen und anschließende Überführung der Probensubstanz in Suprasil-Gefäße
5. Messung der Leerwerte

b) mit der AAS

1. Messung nach Probenaufschluß in Suprasil-Gefäßen
2. Messung nach Probenaufschluß in Duran-Gefäßen

Für sämtliche NAA-Bestimmungen wurden Suprasil-Quarz-Röhrchen (Fassungsvermögen ca. 1.8 ml) mit 48% HF p.a. Merck an ihrer Innenfläche 30 min bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend weitere 30 min in 10% HNO_3 ausgekocht. Die alleinige Reinigung von fünf Röhrchen mit HNO_3 diente der Erfassung des Einflusses der HF-Vorbehandlung auf den Leerwert. Als Standard wurden 100 µl einer wäßrigen Cr^{3+}-Lösung der Konzentration 200 µg/l eingesetzt.
Die Bestrahlung von Proben und Standards erfolgte nach Zuschmelzen der Probengefäße über 24 Stdn. bei einer Neutronenflußdichte von $10^{14}\left[cm^{-2}s^{-1}\right]$. Nach einer Abklinggzeit von 14 Tagen wurden die Probenampullen gebrochen und samt Inhalt in einem Gemisch aus H_2SO_4 konz./ H_2O_2 (2 : 1) bei 250°C über 30 min behandelt. Der Aufschlußrückstand wurde in 20 ml wäßriger Lösung von pH 4 aufgenommen, diese auf die Kolonne gegeben und das Cr^{51} mit Hilfe eines Ge(Li)-Bohrlochdetekors direkt in der Säule bestimmt.
Zur Auswertung des Cr^{51}-Signals bei 320 keV wurden je fünf Kanäle links und rechts des Peakmaximums herangezogen und zu diesem addiert. Die Netto-

impulsmenge des Signals erfolgte durch Subtraktion der Untergrundimpulse von der Bruttoimpulsmenge, indem links und rechts vom Peakbereich wiederum je fünf Kanäle herangezogen wurden. Die Cr-Serumkonzentration ließ sich nun unter Berücksichtigung der Gefäßblindwerte, des ermittelten GF-Faktors von 1.31 und der Untergrundkorrektur mit nachfolgender Beziehung ermitteln:

$$\text{Cr-Konzentration } \mu g/l \text{ Serum} = \frac{I_p \cdot 1.31 \cdot 20}{I_S}$$

hierbei sind : I_p = Probenimpulsmenge
I_S = Standardimpulsmenge bzgl. 20 ng Cr

Der Gefäßblindwert der Suprasil-Quarz-Gefäße nach HF-Vorbehandlung betrug 0.012 ng, nach HNO_3-Vorbehandlung 0.042 ng/g SiO_2. Die Ergebnisse der Referenzmessungen sind in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgeführt.

	a-1	a-2	a-3	a-4	b-1	b-2
Probe I	0.188	(0.717)	0.206	0.213	0.225	0.238
II	0.136	0.179	0.150	0.136	0.134	0.205
III	0.223	0.246	0.291	0.165	0.231	0.260
IV	(0.556)	0.274	0.180	0.305	0.193	0.228
V	(0.436)	0.286	0.207	0.173	0.175	0.203
$\bar{x}$	0.182	0.246	0.207	0.198	0.192	0.227
±s	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.02

Tabelle 5: Vergleichsmessungen von Chrom im Serum zwischen NAA (a) und ZFAAS (b); Werte in µg/l Serum
a-1) Nativserum
a-2) Serum nach Gefriertrocknung (Suprasil-Gefäße)
a-3/b-1) Serum nach O_2-Plasmaveraschung (Suprasil-Gefäße)
a-4/b-2) Serum nach O_2-Plasmaveraschung (Duran-Gefäße)

Die in Klammern gesetzten Werte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da hier mit großer Wahrscheinlichkeit Kontamination erfolgt ist. Die Ergebnisse der Spalte a-1 können nur bedingt in den Vergleich einbezogen

werden, da bei der Bestimmung von Nativserum mit der NAA nur 0.5 ml eingesetzt werden konnte im Vergleich zu 1 ml bei den vorbehandelten Seren[1]. Die Gegenüberstellung beider Meßmethoden für bestimmte Serumproben bei gleicher Vorbehandlung (Mittelwerte aus a-3/a-4 und b-1/b-2) zeigt eine Abweichung der Konzentrationswerte zwischen 5 und 15% bezogen auf $\bar{x}$. Die Gleichung der Regressionsgeraden cNAA = f(cAAS) lautet $y = 0.946x + 0.004$, $r = 0.766$.
Hiermit zeigt sich in Anbetracht der geringen Anzahl von Vergleichsmessungen und der niedrigen Analytkonzentration eine befriedigende Übereinstimmung beider Verfahren. Ein signifikanter Einfluß unterschiedlicher Probenvorbehandlung ist nicht erkennbar. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich im Verlauf der O_2-Plasmaveraschung organische Chromverbindungen teilweise verflüchtigen. In der Literatur liegen hierüber widersprüchliche Angaben vor (27), (83), (84). Der Serumaufschluß in Duran-Gefäßen führt im Fall der AAS-Messungen zu systematisch höheren Cr-Konzentrationen; sie sind durchschnittlich um 0.035 µg/l höher als bei Verwendung von Suprasil-Quarz. Diese Abweichung liegt jedoch um eine Zehnerpotenz unter den gemessenen Serumwerten und ist bei den entsprechenden NAA-Messungen nicht nachweisbar.

3.3. Bestimmung der Blutglukose- und Seruminsulinspiegel

Zur Erfassung möglicher Zusammenhänge mit dem Kohlenhydratstoffwechsel wurde bei jedem Probanden der entsprechende Blutglukose- und Seruminsulinwert mitbestimmt.
Blutglukose wurde nach der Hexokinase-Methode ohne Enteiweißung ("Glucoquant" AV 5040-429-1 Fa. Eppendorf) gemessen. Die Bestimmung der Seruminsulinspiegel erfolgte nach der DAK/PEG-Technik mit Hilfe eines Radioimmunoassays (Fa. Serono Code Nr. 1624). Beide Bestimmungen werden routinemäßig im analytischen Labor des Diabetes-Forschungsinstituts durchgeführt.

---

[1] Bei zu großem Probenvolumen besteht die Gefahr, daß die Quarzampullen aufgrund des zu hohen Druckes platzen, da die Temperatur während der Bestrahlung steigt.

4. Probandenkollektiv

Zur Bestimmung der jeweiligen Serummetallkonzentration beim nüchternen Probanden und im Verlauf des oralen Glukose-Toleranztestes wurden unterschiedliche Kollektive ausgewählt.

4.1. Probandenkollektiv zur Bestimmung der Metall-Nüchternkonzentrationen im Serum - Kollektiv A

Untersucht wurden diabetische Patienten vom Typ I und Typ II mit jeweils guter und schlechter Stoffwechseleinstellung, die sich zur stationären Behandlung im Institut befanden, sowie stoffwechselgesunde Vergleichspersonen im Alter zwischen 20 und 65 Jahren. Ausgenommen von der Untersuchung wurden adipöse sowie untergewichtige Patienten (Broca 20%). Neben routinemäßig bestimmten Laborparametern wurden Umweltfaktoren wie Wohnort, Arbeitsplatz, Lebensgewohnheiten (insbes. Nikotinabusus) sowie Begleiterkrankungen und deren medikamentöse Therapie erfaßt, um evtl. Korrelationen zu erkennen und Fehlinterpretationen vermeiden zu können. Weiterhin wurden Art, verabreichte Menge und Applikationszeit von Insulin bzw. oralen Antidiabetika festgehalten und sämtliche Daten in einem Erhebungsbogen zusammengefaßt.
Anhand der Krankenblätter erfolgte die Auswahl der Patienten am Nachmittag vor der Blutentnahme auf den Stationen. Die Kriterien für gute bzw. schlechte Diabeteseinstellung wurden nach Riecker (79) festgelegt.
Die anschließende Übersicht zeigt die Aufgliederung des Kollektivs A:

1. stoffwechselgesunde Vergleichspersonen
2. Diabetiker Typ I
2.1. Diabetiker Typ I mit guter Einstellung
2.2. Diabetiker Typ I mit schlechter Einstellung
3. Diabetiker Typ II
3.1. Diabetiker Typ II mit guter Einstellung
3.2. Diabetiker Typ II mit schlechter Einstellung

In Tabelle 6 sind die Teilkollektive aufgegliedert nach Anzahl, Geschlecht und mittlerem Alter der Probanden. Der durchschnittliche Anteil der Raucher betrug 22%.

Koll. Nr.	Probandenzahl	Geschlecht männl.	weibl.	mittl.Alter in Jahren
1	19	9	10	35.6
2.1.	14	8	6	33.2
2.2.	22	11	11	29.2
3.1.	19	11	8	60.2
3.2.	17	6	11	66.4

Tabelle 6: Zusammensetzung und Unterteilung des Kollektivs A nach Probandenzahl, Geschlecht und mittlerem Alter

4.2. Probandenkollektiv zur Bestimmung der Chrom- und Zink-Serumkonzentrationen im Verlauf des oralen Glukose-Toleranztests - Kollektiv B

Konzentrationsmessungen im Verlauf des OGTT wurden durchgeführt, um den eventuellen Einfluß einer gezielten Kohlenhydrat-Belastung auf den Serumgehalt an Metallspuren zu erfassen.
Aus ethischen Gründen wurden neben stoffwechselgesunden Vergleichspersonen in diesem Rahmen lediglich Diabetiker vom Typ II - insulinunabhängig und mit guter Diabeteseinstellung - ausgewählt. Die Erfassung der weiteren Parameter erfolgte analog Kollektiv A.
Blutproben wurden nüchtern und im Anschluß an die orale Verabreichung von 100 g Glukose (Glucoprobetrunk, Fa. Boehringer, Mannheim) nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen. Auf eine gleichzeitige Bestimmung von Cadmium wurde verzichtet.

Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des Kollektivs B. Der durchschnittliche Anteil der Raucher betrug 24%.

Probandenzahl	Geschlecht männl.	weibl.	mittl. Alter in Jahren
Vergleichspersonen			
9	6	3	36.8
Diabetiker Typ II			
12	7	5	60.0

Tabelle 7: Zusammensetzung des Kollektivs B nach Probandenzahl, Geschlecht und mittlerem Alter

4.3. Probennahme, Probenaufbewahrung

Proben wurden jeweils morgens zwischen 7^{30} und 8^{00} Uhr mit Hilfe von Teflon-Braunülen (Viggo 1.40/17G) entnommen, indem zunächst ein Vorlauf von 1 ml verworfen und anschließend etwa 8 ml Blut in Polystyrol-Zentrifugenröhrchen gesammelt wurde. Nach 20 min erfolgte Zentrifugieren bei 3200 rpm und Abpipettieren des überstehenden Serums in Polystyrol-Gefäße (Fa. Sarstedt), die mit Schnappverschlüssen aus Polyaethylen verschlossen und bei ca. -20° C eingefroren wurden.

5. Methodenkritik

Die Entwicklung neuer analytischer Verfahren hat in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer enormen Steigerung der Nachweisempfindlichkeit in der Elementspurenanalyse geführt, die die Möglichkeit der quantitativen Messung im ppb-Bereich auch in komplexen Matrices erschließt. Dabei wird jedoch vielfach nicht berücksichtigt, daß im extremen Spurenbereich die herkömmlichen Vorstellungen der quantitativen Analytik umso weniger gelten, je niedriger die zu bestimmenden Elementgehalte liegen, da Fehler durch Reaktionen 2. Ordnung, wie Adsorption an Gefäßmaterialien und Gefäßoberflächen, Wechselwirkungen mit Gasen und Lösungsmitteln besonders an Phasengrenzflächen sowie Elementverluste durch Verfüchtigung beim Probenaufschluß mit sinkender Analytkonzentration exponentiell wirksam werden. Dies gilt in gleichem Maß für die Gefahr der Kontamination in jedem einzelnen Analysenschritt, wobei sich Blindwerte umso schwerer beherrschen lassen, je häufiger das Element in der Umgebung vorkommt. Optimal wäre ein Verbundverfahren, dessen Einzelschritte, also Probenaufschluß, Abtrennung der Elementspuren und ihre Bestimmung, in einem abgeschlossenen System mit kleiner Oberfläche aus weitgehend indifferenten Werkstoffen bei möglichst niedriger Temperatur ablaufen (82).
Die Güte eines Analysenverfahrens wird durch Richtigkeit und Präzision (Reproduzierbarkeit) der gemessenen Werte bestimmt, die durch systematische und statistische Fehler beeinflußt werden. Während letztere durch die niedrigen Nachweisgrenzen der Meßmethoden (AAS, DPASV, NAA) zweitrangig sind, treten systematische Fehler bei der extremen Spurenanalyse in den Vordergrund. Da keine sichere Methode existiert, sie zu erkennen und auszuschließen, ist ihre Vermeidung durch sorgfältige und genaue Arbeitsweise in jedem Analysenschritt oberstes Ziel. Dabei sollten bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten, speziell Blut und Blutserum, folgende Bedingungen eingehalten werden:

- möglichst kontaminationsfreie Probennahme; bei Venenpunktionen hat sich die Verwendung von Teflon-Braunülen und das Verwerfen von ca. 1 ml Vorlauf bewährt (vgl. 26);

- bei Serumbestimmungen sollten Blutproben möglichst ohne Venenstauung zur Vermeidung von Hämolyse gewonnen werden; bei Abnahme von 10 - 12 ml Blut kann diese Bedingung in der Praxis nicht immer eingehalten werden;

- geeignete Bedingungen bei der Probenlagerung; um Elementverluste durch Adsorption an Gefäßoberflächen zu vermeiden, wurden die gewonnenen Serumproben möglichst schnell tiefgefroren;

- sorgfältige Reinigung und ständige Kontaminationskontrolle des verwendeten Analysenmaterials wie Probenaufbewahrungs- und Aufschlußgefäße, Pipetten und Reagenzien;

- die Zahl der eingesetzten Reagenzien sollte so gering wie möglich sein und Stoffe umfassen, die leicht durch Destillation bzw. Umkristallisation gereinigt werden können; beim hier beschriebenen Verfahren wurden lediglich H_2O und HCl Suprapur eingesetzt, vgl. (37);

- ständiges Mitführen eines Blindwertes;

- laufende Oberprüfung der verwendeten Standardlösungen; sämtlich eingesetzte wäßrige Bezugslösungen wurden vor Beginn jeder Meßreihe auf ihren Gehalt hin überprüft und spätestens nach Ablauf von drei Tagen aus einer konzentrierten Stammlösung durch Verdünnung neu angesetzt;

- Kontrolle durch Referenzmaterialien insbesondere bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen in organischen Matrices; im Fall der Cr- und Cd-Analytik war standardisiertes organisches Probenmaterial der Konzentration < 10 µg/l nicht erhältlich; Messungen konnten daher nur stichprobenartig mit unabhängigen Vergleichsverfahren überprüft werden, die zeitlich aufwendig und schwierig zu handhaben sind. Da im Fall der Inversvoltammetrie und der Neutronenaktivierungsanalyse bei Einsatz einer hinreichenden Menge flüssigen Probematerials ebenfalls Vorbehandlungen (zumindest Gefriertrocknung) notwendig sind, konnte deren Einfluß auf die Analyse nicht erfaßt werden.

- möglichst abgeschirmter Arbeitsbereich wie clean-bench oder separates Labor; da diese Voraussetzungen nicht gegeben waren, wurden Probenvorbereitung und Messung grundsätzlich zwischen 17 und 24 Uhr nach Beendigung der Routinearbeit im Labor durchgeführt, um Kontaminationen durch das Laborpersonal zu vermeiden; mögliche Verunreinigungen durch die Raumluft konnten hierduch nicht ausgeschlossen werden.

Die Interpretation der im folgenden Abschnitt aufgeführten Daten sollte unter dem Gesichtspunkt erfolgen, daß eine völlige Vermeidung der aufgezeigten Fehlerquellen nicht möglich ist und kein Anspruch auf absolute Richtigkeit der Werte erhoben wird.

6. Meßergebnisse, Auswertung

Sämtliche ermittelten Daten wurden gespeichert und mit Hilfe eines Rechnerprogramms ausgewertet.

6.1. Probandengruppe A

Im Fall der Probandengruppe A wurden Mittelwerte der einzelnen Teilkollektive für die Chrom-, Cadmium-, Zink- und Insulinkonzentration im Serum sowie die Blutglukosekonzentration erstellt und deren Standardabweichung und mittlerer Fehler errechnet. Zur Erfassung signifikanter Abweichungen bei Vergleich der einzelnen Teilkollektive diente der Stundent-t-Test für unabhängige Stichproben.
Darüberhinaus wurden die gemessenen Serummetallkonzentrationen in Abhängigkeit der Insulin- und Blutglukosespiegel aufgetragen und die Regressionsgerade sowie der Korrelationskoeffizient r errechnet.
Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen wiedergegeben. Tabelle 8 zeigt die Zusammenfassung aller gemessenen Werte; die Konzentrationen der Elementspuren sind in µg/l, Seruminsulin in mU/l und Blutglukose in mg/100 ml angegeben; weiterhin sind Alter, Geschlecht und Raucher miterfaßt. Es bedeuten:

- Koll. Nr. : 1 = stoffwechselgesunde Vergleichspersonen
  2 = Diabetiker Typ I mit guter Einstellung
  3 = Diabetiker Typ I mit schlechter Einstellung
  4 = Diabetiker Typ II mit guter Eintellung
  5 = Diabetiker Typ II mit schlechter Einstellung

- Geschlecht: 1 = männlich
  2 = weiblich

- Rauchen: 1 = Nichtraucher
  2 = Raucher

CASE NO.	LABEL	[illegible] PROBNR	2 KOLLNR	[illegible] SEX	4 ALTER	5 RAUCHEN	6 CR	7 CD	8 ZN	[illegible] GL	10 IN
1		36	1	2	25	1	.450	.440	1100	76	19
2		37	1	1	26	1	.320	.330	1490	84	17
3		39	1	1	22	1	.290	.310	1270	71	34
4		62	1	2	24	1	.280	.550	1023	78	11
5		65	1	2	30	1	.340	.630	1295	84	11
6		67	1	1	61	1	.500	.590	1585	80	10
7		66	1	1	28	1	.430	.570	1235	75	9
8		68	1	2	56	1	.470	.200	1485	89	7
9		69	1	2	60	1	.410	.380	1290	78	7
10		70	1	2	24	1	.200	.270	1244	67	9
11		75	1	2	30	1	.230	.410	1205	73	8
12		76	1	1	32	1	.250	.490	1116	85	8
13		79	1	1	[illegible]	2	.440	.600	1335	80	13
14		[illegible]	1	1	25	1	.400	.170	1205	85	20
15		88	1	1	32	2	.380	.460	1005	82	21
16		89	1	2	24	2	.240	.300	1244	77	16
17		93	1	2	20	1	.120	.280	916	76	4
18		105	1	1	63	1	.150	.500	1207	83	16
19		106	1	2	57	1	.220	.280	1092	65	15
20		6	2	2	70	1	.640	.230	250	119	88
21		23	2	1	16	2	.780	.170	1085	124	52
22		27	2	2	35	1	.340	.350	620	129	36
23		28	2	2	[illegible]	1	.430	.420	725	57	79
24		40	2	2	16	1	.470	.380	1110	91	58
25		48	2	2	16	2	.250	.190	953	100	24
26		57	2	1	14	1	MISSING	.380	550	129	7
27		59	2	1	46	2	.290	.510	1275	136	12
28		61	2	1	[illegible]	1	.270	.400	1023	124	13
29		72	2	1	21	1	.320	.370	1409	169	15
30		73	2	1	19	1	.310	.240	1444	216	21
31		83	2	1	40	1	.150	.210	1234	74	10
32		94	2	2	37	1	.360	.230	860	MISSING	19
33		107	2	1	25	1	.340	.180	1072	MISSING	25
34		1	3	1	23	1	.400	.350	1050	156	48
35		4	3	1	18	2	.720	.330	560	195	81
36		7	3	1	47	1	.310	.640	MISSING	174	10
37		11	3	2	23	1	.320	.260	1060	247	54
38		12	3	1	18	2	.980	.470	1330	206	MISSING
39		13	3	2	58	1	.550	.430	870	72	36
40		14	3	2	34	1	.790	.340	690	145	[illegible]
41		17	3	1	14	1	.580	.340	920	87	MISSING
42		22	3	1	22	2	.470	.650	590	315	39
43		25	3	2	23	1	.480	.510	670	323	45
44		30	3	1	81	2	.350	.480	1035	208	28
45		31	3	1	39	1	.460	MISSING	990	123	89
46		32	3	1	26	2	.360	.370	1025	285	45
47		34	3	1	34	1	.760	MISSING	1332	320	92
48		39	3	1	18	1	.380	.460	1145	385	11
49		41	3	2	18	1	.480	.390	1070	115	59
50		43	3	2	20	1	.330	.470	825	132	25
51		44	3	2	19	1	.730	.410	945	141	65
52		49	3	2	21	2	.540	.340	[illegible]	167	62

Tabelle 8: Serumkonzentrationen von Cr, Cd und Zn in µg/l, Insulin in mU/l Serum sowie Glukose in mg/100 ml Blut

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	[illegible] KOLLNR	3 SEX	4 ALTER	5 RAUCHEN	6 CR	7 CD	[illegible] ZN	9 GL	10 IN
53		[illegible]	3	2	26	1	.400	.200	743	309	70
54		51	3	2	22	[illegible]	.030	.100	915	226	[illegible]
55		77	[illegible]	2	46	1	.450	.400	985	151	26
56		2	4	2	78	1	.310	.270	700	110	15
57		[illegible]	4	2	59	1	.370	.390	980	125	21
58		15	[illegible]	2	72	1	.400	.640	590	130	42
59		19	[illegible]	2	59	1	.300	.640	920	87	31
60		26	[illegible]	2	66	1	.340	.200	990	100	57
61		42	[illegible]	1	66	1	.310	.520	1230	150	20
62		45	4	1	48	2	.200	.440	1165	183	33
63		56	[illegible]	1	76	1	.500	.300	1065	182	[illegible]
64		64	4	1	58	2	.310	.450	1170	104	[illegible]
65		79	[illegible]	1	47	2	.180	.430	MISSING	52	24
66		94	4	2	60	1	.850	.230	1253	116	[illegible]
67		95	[illegible]	1	53	1	.550	MISSING	1207	100	8
68		99	[illegible]	1	64	2	.130	.210	817	MISSING	12
69		60	[illegible]	2	65	1	.340	.410	1075	98	13
70		97	[illegible]	1	48	2	.180	.480	1045	145	[illegible]
71		100	[illegible]	2	64	1	.240	.380	857	123	31
72		101	4	1	54	2	.290	.400	1675	162	[illegible]
73		103	[illegible]	1	47	1	.160	.380	1122	158	8
74		104	4	1	67	1	.220	.460	1169	142	39
75		5	[illegible]	2	57	1	.310	.420	330	240	20
76		10	5	2	64	1	.600	.660	660	47	54
77		19	5	2	60	1	.430	.260	1370	206	29
78		23	5	2	72	1	.590	.340	760	152	[illegible]
79		24	5	2	70	1	.530	.430	890	126	28
80		29	5	1	72	1	.310	.520	385	131	21
81		33	5	1	61	1	.310	MISSING	540	184	25
82		35	[illegible]	1	67	1	.360	.460	1360	247	22
83		46	[illegible]	1	62	[illegible]	.450	.440	847	267	25
84		96	[illegible]	1	49	1	.220	.720	914	163	3
85		97	5	2	63	1	.680	.0600	944	145	MISSING
86		99	5	2	76	1	.100	.460	1341	149	30
87		90	5	2	71	1	.220	.400	912	302	3
88		92	5	2	65	1	.370	.390	916	179	19
89		91	5	2	67	1	.430	.540	820	215	24
90		55	5	1	78	1	.260	1.150	787	155	9
91		102	5	2	74	1	.210	.370	1254	173	23

NUMBER OF CASES READ. 91

Fortsetzung Tabelle 8

Tabelle 9 gibt eine Übersicht der Mittelwerte mit Standardabweichung s und Standardfehler $s_{\bar{x}}$ für Blutglukose-, Insulin- und Serummetallkonzentrationen. Zur Veranschaulichung sind diese Ergebnisse in den Abb. 20 - 22 graphisch dargestellt. Statistisch signifikant ($p < 0.05$) sind niedrige Serumzinkspiegel bei sämtlichen Diabetikern im Vergleich zum Normalkollektiv.

Die mittlere Chromkonzentration zeigt bei insulinabhängigen Diabetikern vom Typ I signifikant höhere Werte gegenüber Typ II und stoffwechselgesunden Vergleichspersonen, wobei sich im wesentlichen Patienten mit schlechter Einstellung (Typ I-) herausheben.

Die Cadmiumspiegel im Serum liegen bei Diabetikern vom Typ I signifikant niedriger als bei den übrigen Probandengruppen; innerhalb dieses Teilkollektivs zeigen Patienten mit guter Stoffwechsellage im Mittel die geringsten Cadmiumkonzentrationen.

Einflüsse von Seiten des Geschlechts und des Rauchens, insbesondere bei Cd, waren für $p < 0.05$ nicht signifikant.

Serumzink- und Chromkonzentrationen nehmen mit dem Alter ab; die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle der Korrelationskoeffizienten r_{xy} betrugen $-0.369 < r < +0.032$ bzw. $-0.357 < r < +0.048$. Im Gegensatz dazu korreliert Cadmium positiv mit dem Lebensalter $0.016 < r < 0.415$.

Eine Abhängigkeit der Metallspuren von der Blutglukosekonzentration war bei keinem der Kollektive ersichtlich. Ebensowenig konnte ein Zusammenhang zwischen Insulin und Zink bzw. Cadmium nachgewiesen werden. Dagegen besteht eine Korrelation zwischen Insulin und Chrom bei Diabetikern.

In den Abb. 23 - 28 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt. Zusätzlich ist die Regressionsgerade $y = a + b_{yx}x$ sowie der Korrelationskoeffizient r_{xy} mit 95%-Vertrauensbereich und zugehöriger Signifikanzschranke für $r \neq 0$ bzgl. $p \leq 0.05$ angegeben.

		n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
Cr µg/l	Normalkoll.	19	0.322	0.144	0.026
	Typ I ges.	35	0.475	0.193	0.032
	I +	13	0.381	0.168	0.046
	I -	22	0.530	0.188	0.040
	Typ II ges.	36	0.353	0.160	0.026
	II +	19	0.329	0.168	0.038
	II -	17	0.380	0.151	0.036
Cd µg/l	Normalkoll.	19	0.408	0.142	0.031
	Typ I ges.	34	0.366	0.123	0.021
	I +	14	0.304	0.109	0.029
	I -	20	0.409	0.117	0.026
	Typ II ges.	34	0.441	0.183	0.031
	II +	18	0.411	0.119	0.028
	II -	16	0.476	0.234	0.058
Zn µg/l	Normalkoll.	19	1224.3	164.5	37.7
	Typ I ges.	35	959.3	268.8	45.4
	I +	14	972.7	341.2	91.2
	I -	21	950.3	216.7	47.3
	Typ II ges.	35	970.8	289.7	48.9
	II +	18	1057.2	240.9	56.7
	II -	17	879.4	315.3	76.4
Insulin mU/l	Normalkoll.	19	13.4	6.9	1.6
	Typ I ges.	34	43.6	26.0	4.4
	I +	14	32.7	26.2	7.0
	I -	20	51.1	23.6	5.2
	Typ II ges.	35	22.8	15.3	2.6
	II +	19	20.8	14.4	3.3
	II -	16	25.1	16.4	4.1
Blutglukose mg/100ml	Normalkoll.	19	79.1	7.0	1.6
	Typ I ges.	34	172.6	78.1	13.4
	I +	12	122.3	41.9	12.1
	I -	22	200.1	80.3	17.1
	Typ II ges.	35	148.6	56.3	9.5
	II +	18	117.9	28.2	6.6
	II -	17	181.2	60.9	14.7

Tabelle 9: Probandengruppe A - Mittelwerte der Serumkonzentrationen von Cr, Cd und Zn sowie Seruminsulin und Blutglukose für die Teilkollektive mit Standardabweichung s und Standardfehler $s_{\bar{x}}$

6.2. Probandengruppe B

Im Fall des oralen Glukose-Toleranztests - Probandengruppe B - wurden Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen und mittleren Fehlern für die jeweiligen Meßzeiten errechnet. Der Student-t-Test diente zur Erfassung signifikanter Abweichungen zwischen stoffwechselgesunden Vergleichspersonen und Diabetikern vom Typ II sowie von Abweichungen der Serummetallkonzentrationen innerhalb eines Kollektivs zu den einzelnen Zeiten der Probennahmen. Die Tabellen 10 - 12 zeigen eine Übersicht der Meßwerte; es bedeuten:

- Koll. Nr. 6 : = Vergleichspersonen
  Koll. Nr. 7 : = Diabetiker Typ II

- Geschlecht: 1 = männlich
  2 = weiblich

- Rauchen: 1 = Nichtraucher
  2 = Raucher

In Tabelle 13 sind die Mittelwerte für die einzelnen Meßzeiten zusammengefaßt. Die Abbildungen 30 und 31 veranschaulichen graphisch die Änderung der Zn- und Cr-Serumkonzentrationen im Verlauf des OGTT. Hierbei wurden die Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern auf einen t_0-Wert = 1 bezogen.

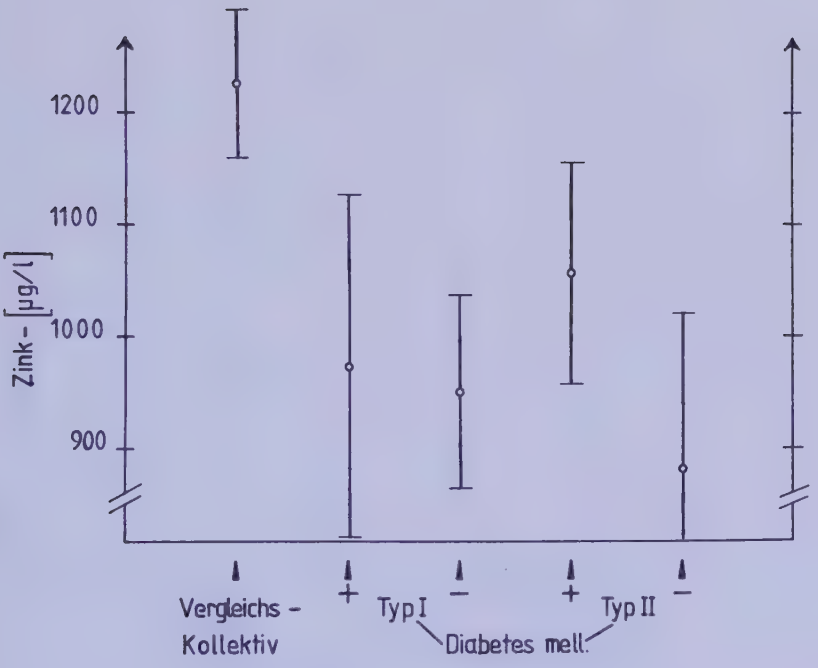


Abb. 20: Zink im Serum -
Mittelwerte der jeweiligen Nüchternspiegel mit zugehörigem Standardfehler (95%-Konfidenzintervall)

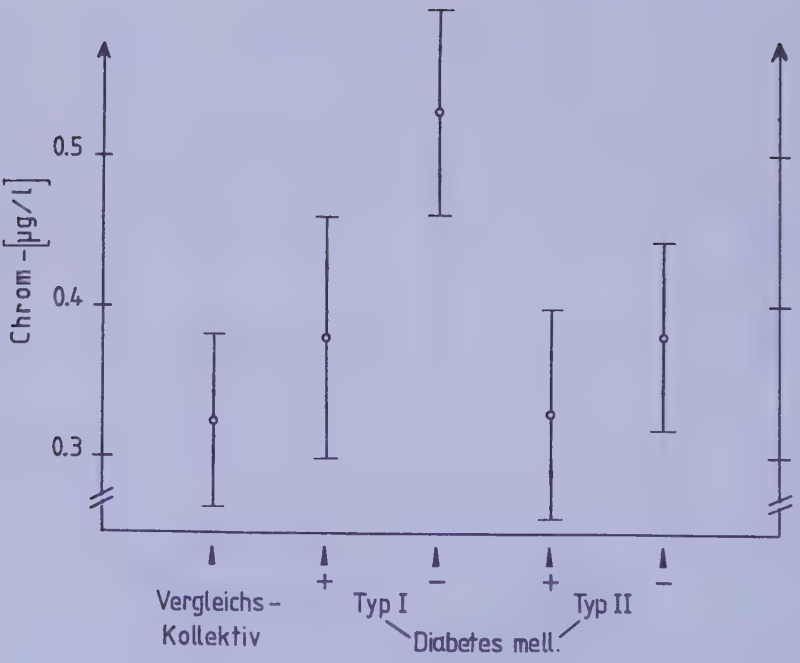


Abb. 21: Chrom im Serum -
Mittelwerte der jeweiligen Nüchternspiegel mit zugehörigem Standardfehler (95%-Konfidenzintervall)

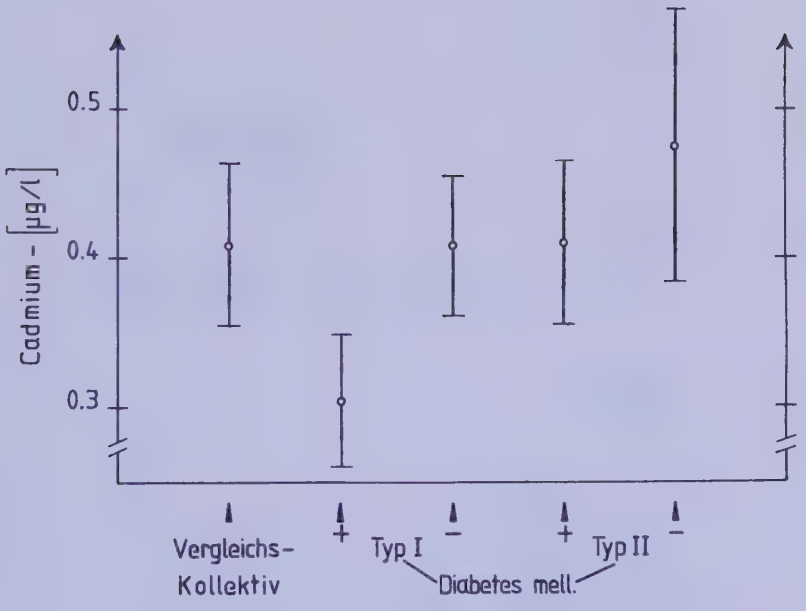


Abb. 22: Cadmium im Serum -
Mittelwerte der jeweiligen Nüchternspiegel mit zugehörigem Standardfehler (95%-Konfidenzintervall)

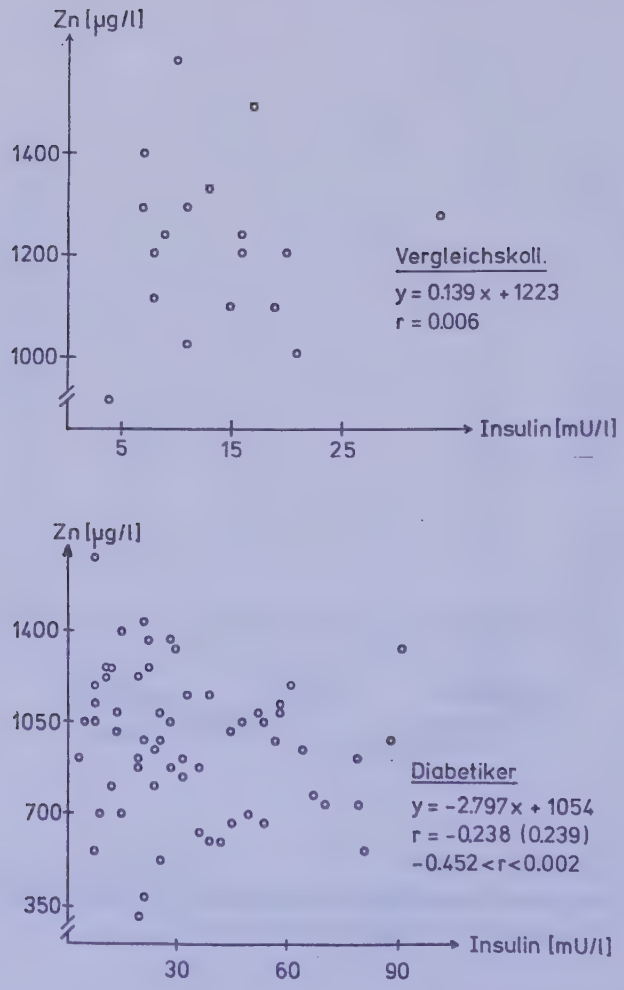
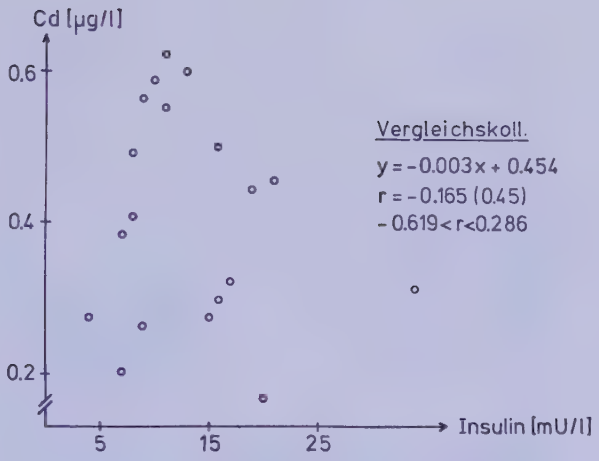


Abb. 22 : Serum-Zink in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration



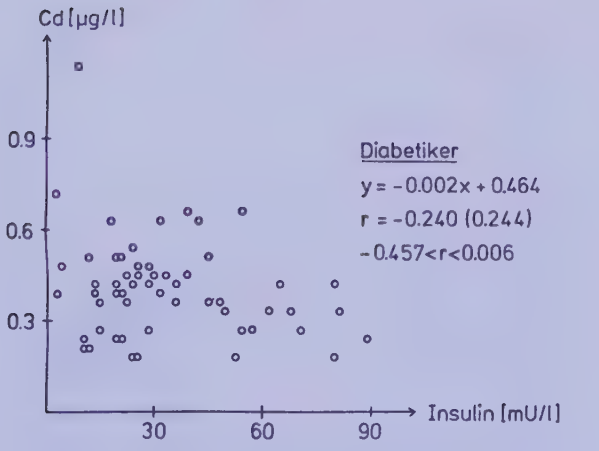


Abb. 24 : Serum-Cadmium in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

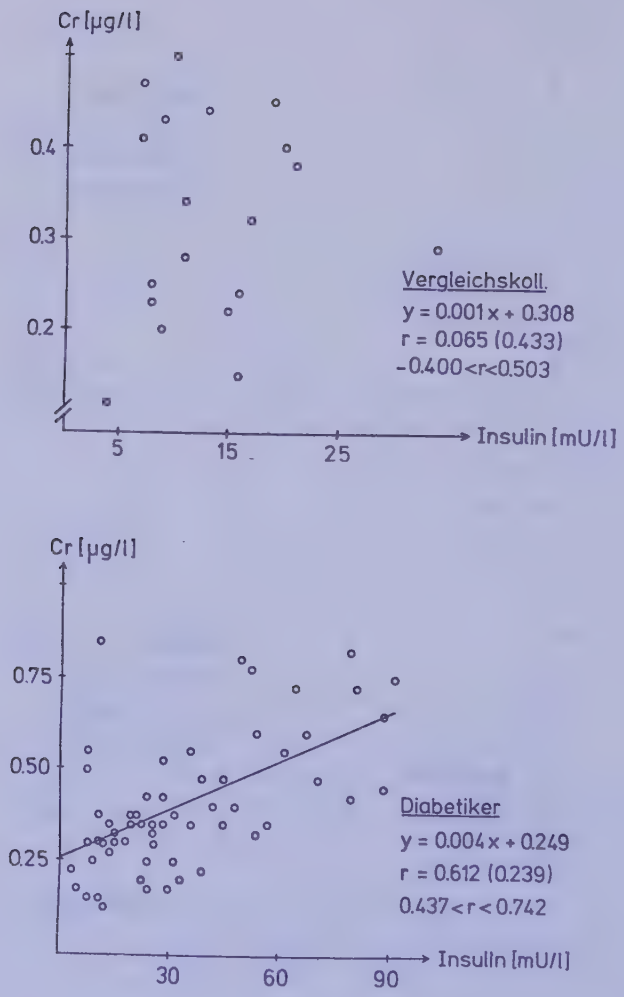


Abb. 25 : Serum-Chrom in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

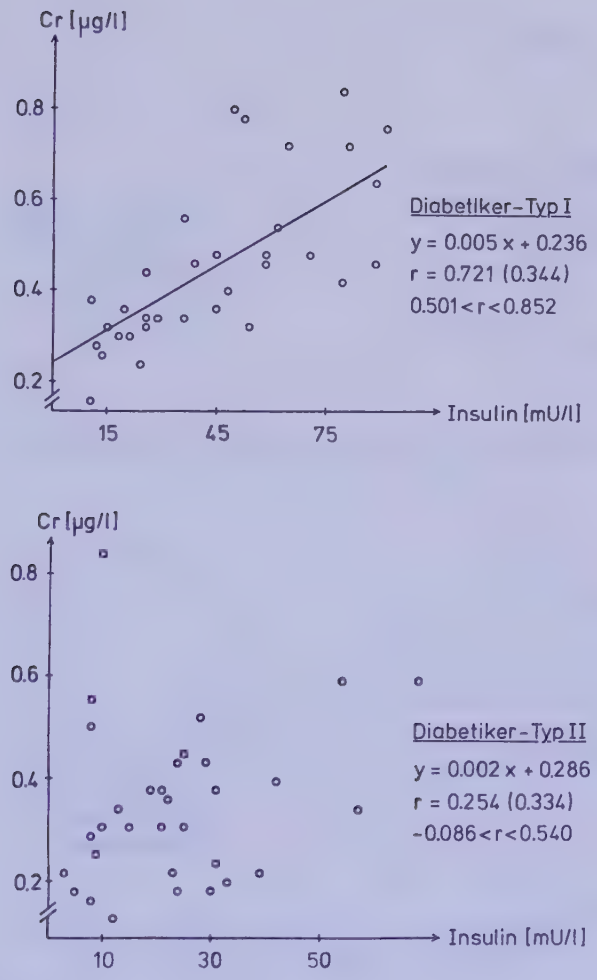


Abb. 26: Serum-Chrom in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration - Diabetiker Typ I / Typ II

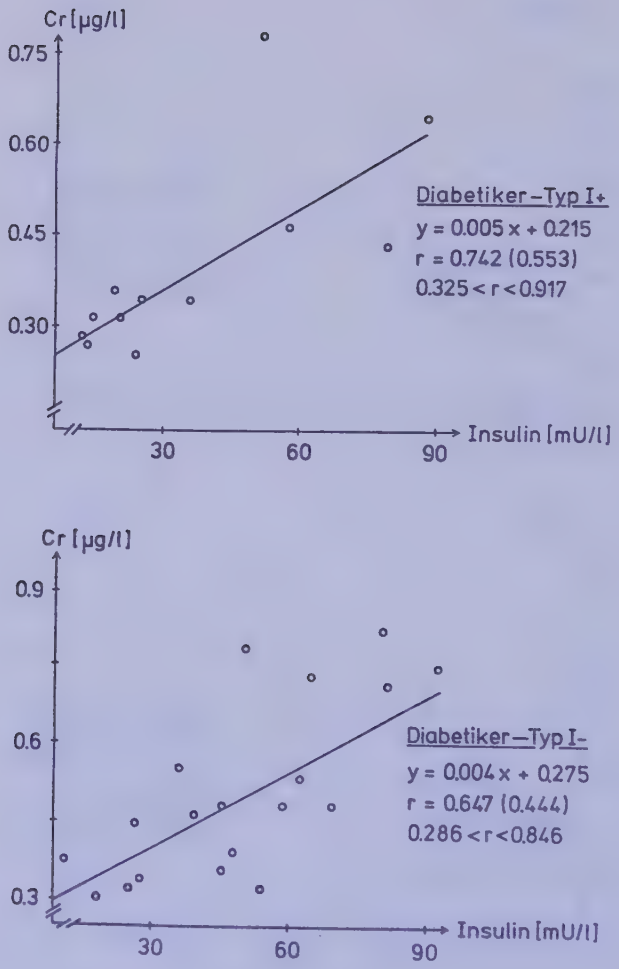


Abb. 27: Serum-Chrom in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration - Diabetiker Typ I+ / Typ I-

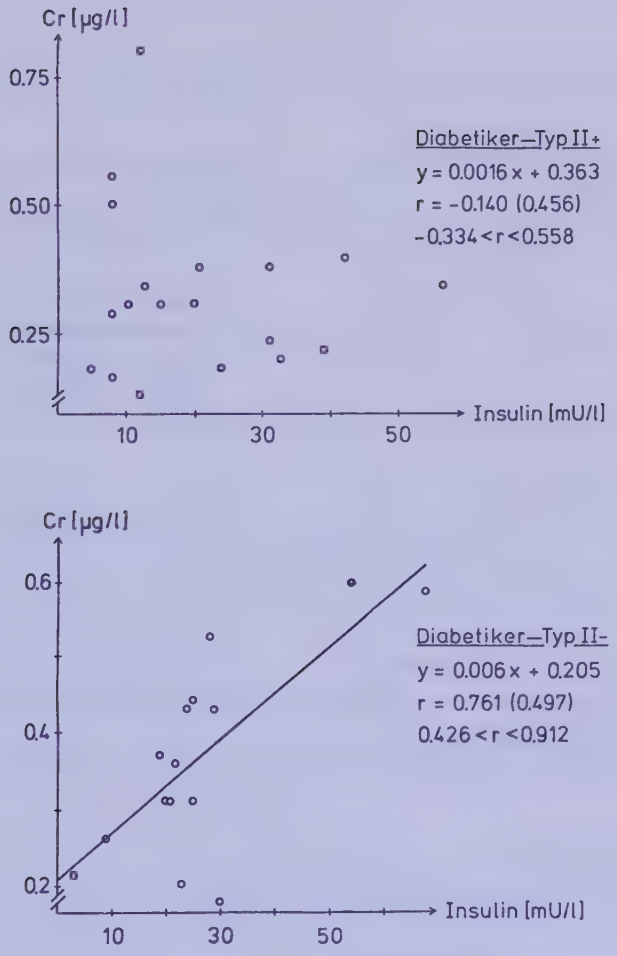


Abb. 28: Serum-Chrom in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration - Diabetiker Typ II+ / Typ II-

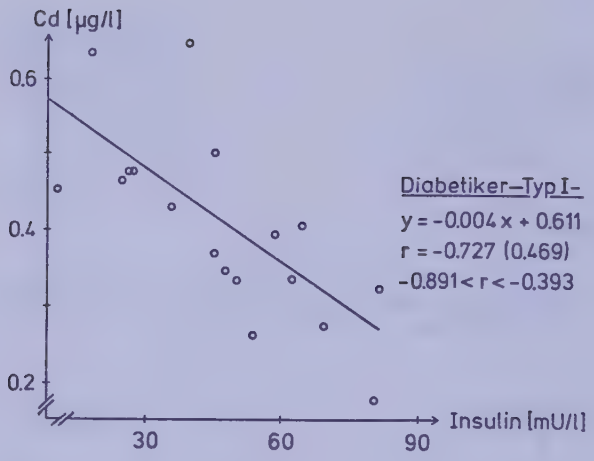


Abb. 29: Serum-Cadmium in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration - Diabetiker Typ I-

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	2 KOLLNR	3 MIN	4 SEX	5 ALTER	6 RAUCHEN	7 CR	8 ZN	9 GL	10 IN
1		110	6	0	1	29	2	.440	1335	88	13
6		111	6	0	1	25	1	.400	1205	88	28
11		112	6	0	1	32	1	.710	1116	87	14
16		113	6	0	1	41	1	.230	819	78	13
21		114	6	0	1	32	2	.300	1005	82	21
26		117	6	0	2	24	1	.240	1244	77	16
31		118	6	0	2	28	1	.120	916	76	4
36		129	6	0	1	63	1	.150	1207	83	16
41		130	6	0	2	57	1	.220	1092	65	16
46		114	7	0	2	53	1	MISSING	1243	116	18
51		115	7	0	1	63	1	MISSING	1244	108	7
56		116	7	0	1	49	1	.550	1207	163	3
61		120	7	0	1	43	2	.180	1875	145	4
66		121	7	0	1	64	2	.130	813	135	12
71		122	7	0	1	76	1	.180	1341	149	30
76		123	7	0	2	64	1	.240	857	143	30
81		124	7	0	2	54	2	.290	1675	162	8
86		125	7	0	1	74	1	.210	1254	173	22
91		126	7	0	2	47	1	.160	1122	158	8
96		127	7	0	1	66	1	.220	1169	142	38
101		128	7	0	1						

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	2 KOLLNR	3 MIN	4 SEX	5 ALTER	6 RAUCHEN	7 CR	8 ZN	9 GL	10 IN
2		110	6	30	1	29	2	.440	927	126	37
7		111	6	30	1	25	1	.420	1152	176	168
12		112	6	30	1	32	1	1	1183	138	79
17		113	6	30	1	41	1	.250	1030	122	183
22		114	6	30	1	32	2	.380	1030	153	94
27		117	6	30	2	24	1	.210	1386	115	113
32		118	6	30	2	28	1	.140	870	95	89
37		129	6	30	1	63	1	.230	943	146	47
42		130	6	30	2	57	1	.230	1040	145	71
47		114	7	30	2	60	1	MISSING	1097	158	21
52		115	7	30	2	63	1	MISSING	712	233	49
57		119	7	30	1	53	1	1.760	1063	142	28
62		120	7	30	1	49	1	.610	804	285	5
67		121	7	30	1	48	2	.310	935	269	14
72		122	7	30	1	64	2	.270	1258	252	52
77		123	7	30	2	76	1	.570	1338	303	41
82		124	7	30	2	64	1	.280	848	215	43
87		125	7	30	1	54	2	.180	1495	254	18
92		126	7	30	2	74	1	.580	1146	248	43
97		127	7	30	1	47	1	.160	1841	196	15
102		128	7	30	1	66	1	.280	1027	233	59

Tabelle 10: Oraler Glukose-Toleranztest -
Serumkonzentrationen von Cr und Zn in µg/l,
Insulin in mU/l Serum sowie Glukose in mg/100 ml Blut
zu den Meßzeiten t = 0 und t = 30 min

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	2 KOLLNR	3 MIN	4 SEX	5 ALTER	6 RAUCHEN	7 CR	8 ZN	9 GL	10 IN
3		110	6	60	1	29	2	.600	770	131	51
8		111	6	60	1	25	1	.330	1097	159	145
13		112	6	60	1	32	1	.300	1129	88	40
18		113	6	60	1	41	1	.390	622	114	86
23		116	6	60	1	32	2	.410	1003	91	100
28		117	6	60	2	24	1	.280	1357	73	95
33		118	6	60	2	28	1	.230	917	73	61
38		129	6	60	1	63	1	.440	897	147	46
43		130	6	60	2	57	1	.330	1038	181	95
48		114	7	60	2	60	1	MISSING	1052	196	24
53		115	7	60	2	63	1	MISSING	611	253	60
58		119	7	60	1	53	1	1.280	1004	179	34
63		120	7	60	1	49	1	.690	775	335	4
68		121	7	60	1	48	2	.250	944	233	16
73		122	7	60	1	64	2	1.240	618	273	94
78		123	7	60	2	76	1	.800	1313	201	62
83		124	7	60	2	64	1	.340	855	245	52
88		125	7	60	1	54	2	.600	1392	317	21
93		126	7	60	2	74	1	.450	1061	302	60
98		127	7	60	1	47	1	.250	1068	227	21
103		128	7	60	1	66	1	.400	998	292	65

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	2 KOLLNR	3 MIN	4 SEX	5 ALTER	6 RAUCHEN	7 CR	8 ZN	9 GL	10 IN
4		110	6	90	1	29	2	.610	787	112	49
9		111	6	90	1	25	1	.780	1062	166	137
14		112	6	90	1	32	1	.800	1144	70	32
19		113	6	90	1	41	1	.390	673	74	85
24		116	6	90	1	32	2	.640	920	58	53
29		117	6	90	2	24	1	.660	1285	71	77
34		118	6	90	2	28	1	.190	858	47	41
39		129	6	90	1	63	1	.370	914	127	38
44		130	6	90	2	57	1	.400	1057	98	48
49		114	7	90	2	60	1	MISSING	1058	240	25
54		115	7	90	2	63	1	MISSING	688	264	63
59		119	7	90	1	53	1	.280	993	139	43
64		120	7	90	1	49	1	.540	757	385	7
69		121	7	90	1	48	1	.240	924	320	25
74		122	7	90	1	64	1	.460	576	265	90
79		123	7	90	2	76	1	.290	1347	285	76
84		124	7	90	2	64	1	.410	868	237	67
89		125	7	90	1	54	2	.330	1400	321	22
94		126	7	90	2	74	1	.220	1072	341	79
99		127	7	90	1	47	1	.270	955	260	28
104		128	7	90	1	66	1	.570	959	356	49

Tabelle 11: Oraler Glukose-Toleranztest - Serumkonzentrationen von Cr und Zn in µg/l, Insulin in mU/l Serum sowie Glukose in mg/100 ml Blut zu den Meßzeiten t = 60 min und t = 90 min

CASE NO.	LABEL	1 PROBNR	2 KOLLNR	3 MIN	4 SEX	5 ALTER	[illegible] RAUCHEN	7 CR	8 ZN	9 GL	10 IN
5		110	6	120	1	29	2	.600	751	118	55
10		111	6	120	1	25	1	.660	1085	102	128
15		112	6	120	1	32	1	.520	1024	83	43
20		113	6	120	1	41	1	.470	767	60	12
25		116	6	120	1	32	2	.500	913	59	43
30		117	6	120	2	24	1	.260	1256	47	99
35		113	6	120	2	28	1	.190	707	60	30
40		129	6	120	1	63	1	.210	897	97	22
45		130	6	120	2	57	1	.280	1016	86	40
50		114	7	120	2	60	1	MISSING	1034	251	28
55		115	7	120	2	63	1	MISSING	595	272	59
60		119	7	120	1	53	1	.290	976	97	27
65		120	7	120	1	49	1	.240	734	420	8
70		121	7	120	1	48	2	.250	817	256	19
75		122	7	120	1	64	2	.230	534	245	67
80		123	7	120	2	76	1	.210	1223	287	67
85		124	7	120	2	64	1	.320	852	223	80
90		125	7	120	1	54	2	.240	1436	330	21
95		126	7	120	2	74	1	.200	1040	331	88
100		127	7	120	1	47	1	.150	952	299	31
105		128	7	120	1	66	1	.380	991	369	55

Tabelle 12: Oraler Glukose-Toleranztest -
Serumkonzentrationen von Cr und Zn in µg/l,
Insulin in mU/l Serum sowie GluKose in mg/100 ml Blut
zu der Meßzeit t = 120 min

	t	Koll. Nr.	n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
Cr µg/l	0'	6	9	0.321	0.184	0.061
	0'	7	10	0.238	0.118	0.037
Zn µg/l	0'	6	9	1104.3	165.9	55.3
	0'	7	12	1135.3	240.9	69.5
Insulin mU/l	0'	6	9	14.8	4.9	1.6
	0'	7	12	15.8	11.6	3.4
Blutglukose mg/100ml	0'	6	9	79.6	8.2	2.7
	0'	7	12	144.3	20.3	5.9
Cr µg/l	30'	6	9	0.367	0.259	0.086
	30'	7	12	0.544	0.485	0.153
Zn µg/l	30'	6	9	1011.2	193.5	64.5
	30'	7	12	1013.0	243.9	70.4
Insulin mU/l	30'	6	9	88.1	36.6	12.2
	30'	7	12	32.7	17.9	5.2
Blutglukose mg/100ml	30'	6	9	135.1	23.6	7.9
	30'	7	12	235.5	50.3	14.5
Cr µg/l	60'	6	9	0.423	0.177	0.059
	60'	7	12	0.638	0.383	0.121
Zn µg/l	60'	6	9	980.0	212.9	70.9
	60'	7	12	974.2	238.7	68.9
Insulin mU/l	60'	6	9	80.7	34.4	11.5
	60'	7	12	43.4	27.1	7.8
Blutglukose mg/100ml	60'	6	9	108.6	31.4	10.5
	60'	7	12	261.1	47.7	13.8

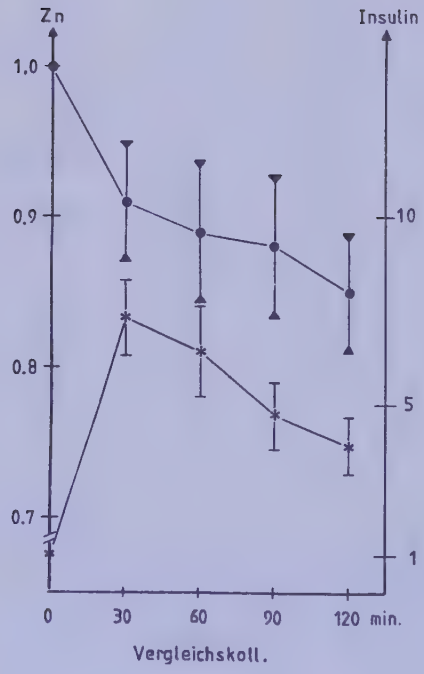
Tabelle 13: Oraler Glukosetoleranztest -
Mittelwerte der Serumkonzentrationen von Cr, Zn, Insulin und Blutglukose mit Standardabweichung und Standardfehler

Fortsetzung Tabelle 13

	t	Koll. Nr.	n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
Cr µg/l	90'	6	9	0.537	0.211	0.070
	90'	7	10	0.361	0.126	0.040
Zn µg/l	90'	6	9	966.7	188.8	62.9
	90'	7	12	959.7	250.3	72.2
Insulin	90'	6	9	62.2	33.1	11.0
mU/l	90'	7	12	47.8	26.8	7.7
Blutglukose	90'	6	9	92.3	37.5	12.5
mg/100ml	90'	7	12	285.1	65.7	18.9
Cr µg/l	120'	6	9	0.410	0.177	0.059
	120'	7	10	0.251	0.065	0.021
Zn µg/l	120'	6	9	935.1	178.9	59.6
	120'	7	12	932.0	251.8	72.6
Insulin	120'	6	9	52.4	37.5	12.5
mU/l	120'	7	12	45.8	26.5	7.6
Blutglukose	120'	6	9	79.1	23.9	7.9
mg/100ml	120'	7	12	281.6	81.2	23.4

Koll. Nr.	t	Cr±$s_{\bar{x}}$	Zn±$s_{\bar{x}}$	Insulin±$s_{\bar{x}}$	Glukose±$s_{\bar{x}}$
6	30'	1.13 ± 0.07	0.91 ± 0.04	7.29 ± 1.94	1.71 ± 0.1
7	30'	2.36 ± 0.56	0.88 ± 0.06	2.41 ± 0.33	1.63 ± 0.0
6	60'	1.51 ± 0.21	0.89 ± 0.05	6.20 ± 1.25	1.36 ± 0.1
7	60'	3.03 ± 0.79	0.86 ± 0.02	3.12 ± 0.53	1.81 ± 0.0
6	90'	1.82 ± 0.17	0.88 ± 0.05	4.71 ± 0.90	1.15 ± 0.1
7	90'	1.76 ± 0.28	0.84 ± 0.03	3.68 ± 0.55	1.96 ± 0.0
6	120'	1.38 ± 0.12	0.85 ± 0.04	3.80 ± 0.79	0.99 ± 0.0
7	120'	1.17 ± 0.12	0.81 ± 0.03	3.32 ± 0.33	1.92 ± 0.1

Tabelle 13a : Relative Mittelwerte und zugehöriger SEM, normiert auf $t_o = 1$



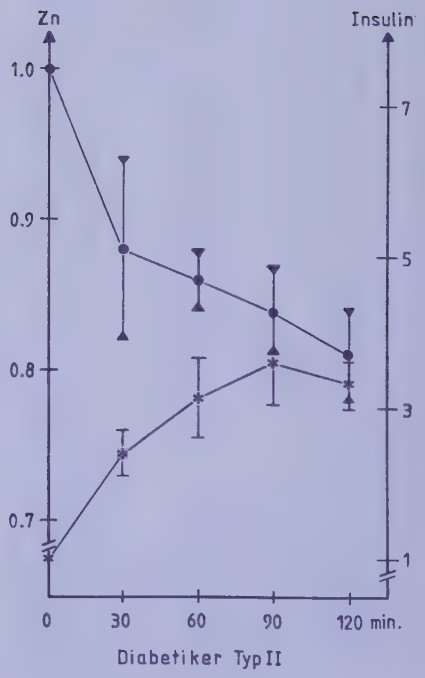


Abb. 30: Relative Zink- (●) und Insulinkonzentration (*) im Verlauf des OGTT

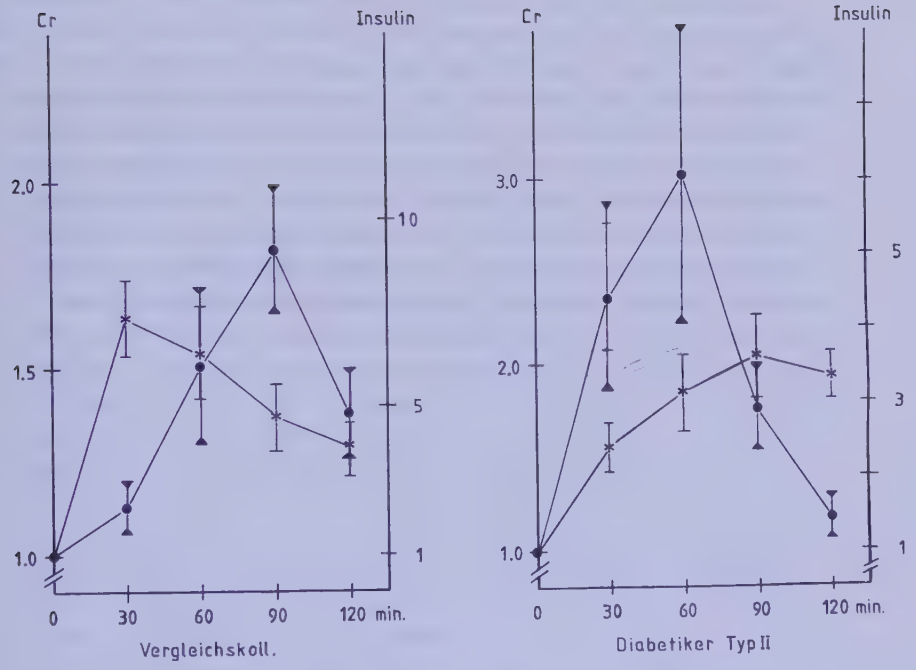


Abb. 31: Relative Chrom- (•) und Insulinkonzentration (*) im Verlauf des OGTT

Nach oraler Glukosebelastung nimmt die Serumzinkkonzentration besonders innerhalb der ersten 30 min ab. Dieser Abfall zeigt sich bei 17 von 21 untersuchten Probanden und war im Fall der Diabetiker Typ II stärker ausgeprägt. Es bestand jedoch für $p < 0.05$ sowohl bei Vergleich der Mittelwerte zu den einzelnen Meßzeiten, als auch beim Vergleich der Probandengruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt t kein signifikanter Unterschied.
Im Gegensatz zu Zink steigt die mittlere Chromkonzentration im Verlauf des OGTT an und durchläuft ein Maximum. Dieses wird bei Diabetikern Typ II nach einer Stunde erreicht und ist deutlicher ausgeprägt als der Maximalwert des Vergleichskollektivs bei 90 min. Der Anstieg der Serumchromkonzentration erfolgt hier verzögert gegenüber der initialen Insulinausschüttung. Beim Vergleich der Mittelwerte zeigten sich im Fall des Normalkollektivs signifikante Unterschiede zwischen dem 0' und 90'- Wert für $p < 0.05$. Bei Diabetikern vom Typ II weichen die Werte zu den Meßzeiten 0' und 60' sowie 60' und 120' signifikant voneinander ab ($p < 0.01$). Darüberhinaus liegen die mittleren Chromkonzentrationen zwei Stunden nach Glukosebelastung bei Diabetikern Typ II deutlich niedriger als beim Vergleichskollektiv.

7. Diskussion

Vor allem Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Meßwerte bestimmen neben der Spezifität und Sensitivität der Meßmethode die Güte eines Analysenverfahrens.
Das Problem der extremen Spurenmetallanalyse in organischen Proben ist trotz der hohen Empfindlichkeit der elektrothermalen AAS mit dem Erwerb einer entsprechenden Apparatur allein nicht gelöst, da die Direktbestimmung der Elementspuren durch unspezifische Absorption häufig zu erhöhten und nicht reproduzierbaren Meßergebnissen führt. Der Konzentrationsmessung (Endbestimmung) müssen daher Analysenschritte zum Probenaufschluß und gegebenenfalls Anreicherung vorangehen. Ferner ist bei genügender Reproduzierbarkeit der Meßwerte deren Richtigkeit auch bei Anwendung der internen Standardaddition noch nicht garantiert, da systematische Fehler unbemerkt bleiben. Um zu einem 'gesicherten Wert' zu gelangen, ist eine Parallelmessung mit einem methodisch unabhängigen Analysenverfahren notwendig. Als Vergleichs- und Referenzmethode eignet sich neben der Inversvoltammetrie vor allem die Neutronenaktivierungsanalyse, die zwar apparativ aufwendig ist, jedoch kaum Probenvorbehandlung erfordert.
Angesichts der bestehenden analytischen Probleme sollten routinemäßige Spurenelementbestimmungen Speziallaboratorien mit geeigneter apparativer Ausstattung und geschultem Personal vorbehalten bleiben. Darüberhinaus ist eine effektive interne und externe Qualitätskontrolle mit geeigneten Referenzmaterialien im unteren ppb-Bereich dringend erforderlich, die leider jedoch noch nicht zur Verfügung stehen.
Allgemeine Aussagen über Metallspuren in Serumproben diabetischer Patienten sind infolge des beschränkten Stichprobenumfangs nur bedingt möglich und sollten mit der Einschränkung gemacht werden, daß Schwermetallkonzentrationen in Körperflüssigkeiten von einer Vielzahl Parameter abhängig sind. Hierzu zählen neben Langzeitfaktoren wie geographische und Umwelteinflüsse (z.B Exposition am Wohnort und Arbeitsplatz, Lebensgewohnheiten, Nahrungszusammensetzung) auch kurzfristige Einflüsse wie Jahreszeit, Körperhaltung und Stressfaktoren (61); darüberhinaus sind auch Stoffwechselerkrankungen und deren Verlauf bedeutsam (Stoffwechseleinstellung des Diabetes mellitus).

Aus den erhaltenen Daten ist im Fall von Cadmium ein Zusammenhang mit dem Kohlenhydratstoffwechsel wenig wahrscheinlich. Da die Cd-Konzentration im Serum im Gegensatz zu Untersuchungen von PetitClerc et al. (21) signifikant mit dem Lebensalter ansteigen, sind die niedrigeren Serumspiegel bei Diabetikern Typ I im Vergleich mit Typ II auf die unterschiedliche Altersstruktur der Kollektive zurückzuführen; damit können jedoch nicht die gegenüber Typ I- signifikant niedrigeren Spiegel bei Typ I+ erklärt werden. Darüberhinaus ist eine negative Korrelation mit Insulin bei allen Kollektiven, insbesondere Typ I- auffallend. Eine abschließende Erklärung dieses Befundes ist derzeit nicht möglich.

Der Grund für die bei Diabetikern gemessenen niedrigen Zink-Serumkonzentrationen ist nicht bekannt, könnte jedoch auf einer vermehrten Zn-Ausscheidung im Urin beruhen, die von McNair et al. (39) beschrieben wurde. Allerdings beobachteten diese Autoren keine erniedrigten Serumspiegel im Gegensatz zu Kumar und Jaya-Rao (41). Einflüsse von Seiten des Diabetestyps und der Stoffwechseleinstellung sind kaum anzunehmen. Die abfallende Serum-Zinkkonzentration nach oraler Glukosebelastung, die auch postprandial beobachtet wurde, vgl. (47) und (76), steht wahrscheinlich mit der Abgabe von Enzymen aus dem exokrinen Pankreas in Zusammenhang.

Im Gegensatz zu Cd und Zn korreliert Chrom im Serum aller Probandengruppen positiv mit dem Insulinspiegel. Diese Zusammenhänge sind bei Diabetikern vom Typ I (insulin dependent diabetes mellitus) im Gegensatz zu Diabetikern vom Typ II (non insulin dependent diabetes mellitus) signifikant im Vergleich zu stoffwechselgesunden Probanden. Im Einklang damit stehen die hohen Serumchromkonzentrationen im Fall schlecht eingestellter Patienten vom Typ I, bei denen gegenüber Typ I+ im Mittel um den Faktor 1.5 höhere Insulinkonzentrationen gemessen wurden (strengere Einstellung), vgl. (48,49). Dabei muß bemerkt werden, daß die Chromkonzentrationen der injizierten Insulinpräparate vernachlässigbar sind. Im Fall diabetischer Patienten vom Typ II ist bei Berücksichtigung der Stoffwechseleinstellung dieser Effekt nur angedeutet.

Es ist überraschend, daß im Verlauf des OGTT bei oral bzw. mit Diät eingestellten Diabetikern trotz verminderter Insulinsekretion ein signifikanter Anstieg der Serumchromkonzentration wie beim Vergleichskollektiv registriert wurden. Ähnliche Beobachtungen werden von Gedik et al. (57) beschrieben, doch liegen die von diesen Autoren mit der flammenlosen AAS

gemessenen Chromkonzentrationen um den Faktor 5 - 10 zu hoch. Darüberhinaus wird in dieser Arbeit nicht auf die bei Cr-Messungen im Serum notwendige Probenvorbehandlung eingegangen.
Aufgrund von Literaturdaten und vorliegenden Ergebnissen kann ein Zusammenhang zwischen Insulin (appliziert oder endogen freigesetzt) und Chrom angenommen werden und weist auf eine Bedeutung dieses Metalls im Kohlenhydratstoffwechsel hin. In diesem Zusammenhang sei auch der eingangs erwähnte GTF-Faktor genannt, vgl. (28), (30), (58), (85), dessen Existenz jedoch noch nicht gesichert ist.

8. Schlußfolgerung

Das analytische Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung eines Analysenverfahrens zur Messung der Spurenmetallkonzentrationen von Zink, Cadmium und Chrom in Humanseren mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie, in der Aufdeckung möglicher Elementverlust- und Kontaminationsquellen sowie der Untersuchung von Matrixeffekten auf die Analyse. Dabei sollte das Verfahren in einem klinisch-biochemischen Labor auf seine routinemäßige Anwendung hin überprüft werden.

Es zeigt sich, daß unter diesen Bedingungen Konzentrationsbestimmungen von Zink im Serum mit der Flammenatomabsorptionsspektroskopie durchführbar sind. Da Matrixeffekte vernachlässigt werden können, ist ein Aufschluß organischen Probenmaterials nicht erforderlich und der Einsatz wäßriger externer Bezugstandards möglich.
Dagegen sind Messungen von Cadmium und Chrom im Serum mit Hilfe der elektrothermalen Atomabsorptionsspektroskopie auch bei Verwendung einer leistungsfähigen Untergrundkompensation (Zeeman-Effekt) nur mit zusätzlicher Probenaufarbeitung durchführbar. Da diese Probenvorbehandlung einen nicht unbeträchtlichen Zeitaufwand sowie analytisches Geschick erfordert und neben speziell geschultem Personal eine geeignete apparative Ausstattung voraussetzt, ist eine Routineanalytik in einem klinisch-biochemischen Labor nicht realisierbar. Zudem sind die Analysendaten derzeit nur durch Parallelmessung mit unabhängigen Methoden zu sichern. Die Einführung von biologischen Referenzmaterialien mit definierten Zielwerten im Konzentrationsbereich < 10 µg/l für die interne und externe Qualitätskontrolle könnte die Erfassung systematischer Fehler erleichtern.

Im weiteren Rahmen der Arbeit wurden systematische Messungen in Seren von Diabetikern und Normalpersonen durchgeführt, um eine mögliche Bedeutung der Spurenmetalle Chrom, Cadmium und Zink im Kohlenhydratstoffwechsel zu erfassen.

Zusammenhänge zwischen Cadmium und Kohlenhydratstoffwechsel speziell bei Diabetes mellitus sind aus den vorliegenden Daten nicht sicher abzuleiten. Die erniedrigten Serumzinkwerte bei Diabetikern deuten auf Zusammenhänge zwischen dem Serumspiegel und einer diabetischen Stoffwechsellage hin. Dagegen ist die Abnahme der Serumzinkkonzentration nach oraler Glukosebelastung eher einer Stimulation des exokrinen Pankreas zuzuordnen.
Chrom ist mit dem Insulinstoffwechsel korreliert, wobei die Interpretation dieses Befundes derzeit nicht möglich ist. Eine Bedeutung bei der Pathogenese des Diabetes mellitus oder der Insulinwirkung am Receptor wurde bisher nicht nachgewiesen.
Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht wahrscheinlich, daß der Diabetes mellitus durch die hier analysierten Spurenmetalle wesentlich beeinflußt wird.

9. Literaturverzeichnis

1. Hollemann, A.F., Wiberg, E.: Lehrbuch der Anorg. Chemie, 743-750 (1971) W. de Cruyter & Co., Berlin

2. Enzyklopädie Nat. Wiss. u. Technik, 5246-5249 (1981) Verlag Moderne Industrie, München

3. Cotton, F.A., Wilkinson, G.: Anorg. Chemie, 567 (1970) Verlag Chemie, Weinheim, Interscience Publishers

4. Finkelnburg, W.: Einführung in die Atomphysik, 108-123 (1967) Springer Verlag, Berlin

5. Seeling, W.: Spurenelemente in Forschung und Klinik. Infusionstherapie 4, 181-190 (1977)

6. Jeejeebhoy, K.N.: Chromium deficiency, diabetes and neuropathy reserved by Cr infusion in a patient on total parenteral nutrition (TPN) for 3 1/2 years. Clin. Res. 23, 636A (1975)

7. Enzyklopädie Nat. Wiss. u. Technik, 624-625 (1980) Verlag Moderne Industrie, München

8. Singhal, R.L., Merali, Z.: Diabetogenic effects of chronic oral Cadmium administration to neontal rats.
British J. Pharmacology 69, 151-157 (1980)

9. Koizumi, H., Yasuda, K., Katayama, M.: Atomic absorption spectrometry based on the polarization characteristics of the Zeeman Effect.
Analyt. Chem. 49/8, 1106-1112 (1976)

10. Szydlowski, F.J., Peck, E., Rax, B.:
Optimization of pyrolytic coating procedure for graphite tubes used in AAS. Appl. Spectroskopy 32/4, 402-404 (1978)

11. Manning, D.C., Ediger, R.D.: Atomic Absorption Newsletter 15, 42 (1976)

12. Sturgeon, R.E., Chakrabarti, C.L.: Evaluation of pyrolytic graphite coated tubes for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Analyt. Chem. 49, 90 (1977)

13. Szydlowski, F.J., Vianzon, F.R.: Graphite Tube Furnace Atomic Absorption. Analysis of Ba in products intended for parenteral administration. Anal. Letters 11B, 161 (1978)

14. Sturgeon, R.E., Chakrabarti, C.L.: Mechanism of atom loss in Graphite Furnace AAS. Analyt. Chem. 49, 1100-1106 (1977)

15. Hollemann, A.F., Wiberg, E.: Lehrbuch der Anorg. Chemie, 784-795 (1971) W. de Gruyter & Co., Berlin

16. Enzyklopädie Nat. Wiss. u. Technik, 760 (1980) Verlag Moderne Industrie, München

17. Wirth, W., Gloxhuber, C.: Toxikologie, 117-119 (1981) Thieme, Stuttgart

18. Chakrabarti, C.L., Sturgeon, R.E., Langford, C.H.: Studies on the mechanism of atom formation in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Analyt. Chem. 48, 1792 (1976)

19. L'Vov, B.V.: "Electrothermal Atomization - The Way Towards Absolute Methods of Atomic Absorption Analysis", presented as an invited paper at the 3rd FACSS-Meeting and the 6th International Conference on Atomic Spectroscopy, (1976) Nov. 15-19, Philadelphia Pa.

20. Zink, E.W., Askew, L.R.: Anodic Stripping Voltammetry - a new simple answer for lead residue analysis, Environmental Sciences Associates, Inc./Burlington, Mass.; repr. from Food Product Dev., (1975) Dec.

21. PetitClerc, C., Munan, L., Kelly, A., Cote, M.: Serum Cadmium concentrations in patients from a cardiac clinic and in healthy controls. In: Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, S.S. Brown (edit.), 157-160 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

22. Wirth, W., Gloxhuber, C.: Toxikologie, 110-111 (1981) Thieme, Stuttgart

23. Bernard, A., Roels, H., Buchet, J.P., Masson, P.L., Lauwerys, R.: Alpha-1-Antitrypsin levels in workers exposed to Cadmium. In: Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, S.S. Brown (edit.), 161-164 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

24. Valenta, P., Rützel, H., Nürnberg, H.W., Stoeppler, M.: Trace Chemistry of toxic metals in biomatrices, II. Voltammetric Determination of trace content of Cadmium and other toxic metals in human whole blood. Z. Anal. Chem. 285, 25-34 (1977)

25. Del Castilho, P., Herber, R.F.M.: The rapid determination of Cd and Pb in whole blood by FAAS. In: Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, S.S. Brown (edit.), 361 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

26. Speecke, A., Hoste, J., Versieck, J.: Sampling of biological materials. In: Accuracy in Trace Analysis: Sampling, Sample Handling and Analysis. Proceedings of the 7th IMR-Symposium, 299-310 (1974), Gaithersburg, Md.

27. Versieck, J., Hoste, J., Barbier, F., Steyaert, H., De Rudder, J., Michels, H.: Determination of Cobalt and Chromium in human serum by Neutron Activation Analysis. Clin. Chem. 24/2, 303-308 (1978)

28. Mertz, W., Töpfer, E.W., Roginski, E.E., Polansky, M.M.: Present knowledge of the role of Chromium. Fed. Proceedings 33/11, 2275-2280 (1974)

29. Wirth, W., Gloxhuber, C.: Toxikologie, 119-120 (1981) Thieme, Stuttgart

30. Mertz, W., Töpfer, E.W., Polansky, M.M., Roginski, E.E., Wolf, W.R.: Preparation of Chromium containing material of Glucose Tolerance Factor activity from brewers yeast extracts and by synethesis. J. Agric. Food Chem. 25/1, 162-165 (1977)

31. Anand, V.D., Ducharme, D.M.: Stability of Chromium ions at low concentrations in aqueous and biological matrices stored in glass, polyethylene and polycarbonate containers. In: Accuraxy in Trace Analysis: Sampling, Sample Handling and Analysis. Proceedings of the 7th IMR-Symposium, 611-619 (1974), Gaithersburg, Md., National Bureau OF Standards, Special Publication 422

32. Pinta, M.: Modern methods for Trace Element Analysis, 153-155 (1978) Ann Arbor Science Publishers INC, Ann Arbor, Mich.

33. Underwood, E.J.: Trace Elements in human and animal nutrition, 200 (1977) Academic Press, New York, San Francisco, London

34. Becker, W.M., Hoeckstra, W.G.: Intestinal Absorption of Metal Ions, Trace Elements and Radionuclides, 229 (1971) Pergamon Press, Oxford

35. Quarterman, J., Florence, E.: Observations on glucose tolerance and plasma levels of free fatty acids and insulin in the zinc-deficient rat. British J. Nutr. 28, 75 (1972)

36. Allain, P., Mauras, Y.: Microdetermination of Lead and Cadmium in blood and urine by Graphite Furnace AAS. Clin. Chim. Acta 91, 41-46 (1979)

37. Iyengar G.V., Sansoni, B.: Sample preparation of biological materials for Trace Element Analysis. Techn. Reports Series No. 197 (1980), IAEA, Wien

38. Emdin, S.O., Dodson, G.G., Cutfield, J.M., Cutfield, S.M.: Role of Zinc in insulin biosynthesis, some possible Zn/insulin interactions in the pancreatic B-cell. Diabetologica 19, 174-182 (1980)

39. McNair, P., Kiilerich, S., Christiansen, C.: Hyperzincuria in insulin treated diabetes mellitus, its relation to glucose homeostasis and insulin administration. Clin. Chim. Acta 112, 343-348 (1981)

40. Rechetoille, A., Deroche, R., Corlay, J.P., Jalley, G.: Role eventuel d'une carence metallique dans la pathogenie de certain nevrites optiques toxiques et nutritionelle. Bull. Soc. franc. Ophtal. 87, 227-232 (1976)

41. Kumar, S., Jaya-Rao, K.S.: Blood and urinary Zinc levels in diabetes mellitus. Nutr. Metab. 17, 231-235 (1974)

42. Khattab, M., Danasoury, M., Sharaf, M., Sherbeny, A.E.: Zinc in serum and urine of diabetics. J. Egypt. Med. Assoc. 59, 597-601 (1976)

43. Davies, I.J.T., Musa, M., Dormandy, T.L.: Measurements of plasma Zinc. J. Clin. Pathol. 21, 359-365 (1968)

44. Pidduck, H.G., Wren, P., Evens, D.A.: Plasma Zinc and Copper in diabetes mellitus. Diabetes 19, 234-239 (1970)

45. Chooi, M.K., Todd, J.K., Boyd, N.D.: Influence of age and sex on plasma zinc levels in normal and diabetic individuals. Nutr. Metab. 20, 135-142 (1976)

46. Mateo, M.C., Bustamante, J.B., Cantalapiedra, M.A.: Serum Zinc, Copper and insulin in diabetes mellitus. Biomed. (Express) 29, 56-58 (1978)

47. Kiilerich, S., Christensen, M.S., Naestoft, J., Christiansen, C.: Determination of Zinc in serum and urine by AAS, relationship between serum levels of Zinc and proteins in 104 normal subjects. Clin. Chim. Acta 105, 231-239 (1980)

48. Vanderlinde, R.E., Kayne, F.J., Simmons, M.J., Tsou, J.Y., Lavine, R.L.: Serum and urine levels of Chromium in healthy and insulin dependent diabetic subjects. Diabetes 28, 435 (1978)

49. Kayne, F.J., Vanderlinde, R.E., Komar, G., Simmons, M.J., Tsou, J.Y., Lavine, R.L.: Serum and urine levels of Chromium, In: Chromium in Nutrition and Metabolism, D. Shapcott and J. Hubert (edit.), 49-57 (1979) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

50. Hertel, R.W.: Chrom als Problem in Physiologie, Epidemiologie und beim Biolog. Monitoring. Staub, Reinhaltung der Luft 4, 135-137 (1982)

51. Maclele, W., Gregorius, F.: Public Health Reports 63, 1114 (1948)

52. Mertz, W.: Chromium occurance and function in biological systems. Physiological Rev. 49, 163 (1969)

53. Langard, S., Norseth, T.: A cohort study of bronchial carcinomas in workers producing chromate pigments. Br. J. Med. 32, 62 (1975)

54. Royle, H.: Toxicity of Chromic-Acid in the Chromium plating industry (1). Environ. Res. 10, 39 (1975)

55. Axelsson, G., Rylander, R., Schmidt, A.: Mortality and incidence of tumors among ferrochromium workers. Br. J. Ind. Med. 37, 121 (1980)

56. Shamberger, R., Beneficial Effects of Trace Elements, Toxicity of Heavy Metals in the environment, part 2, F.W. Oehme (edit.), 689-696 (1979) Dekker, New York

57. Gedik, O., Onal, S., Koray, Z.: Glucose tolerance, insulin secretion and plasma trivalent Chromium in juvenile and adult onset diabetes mellitus. Isr. J. Med. Sci. 16, 563-565 (1980)

58. Mertz, W.: Chromium and its relation to carbohydrate metabolism. Med. Clin. North Am. 60, 4739 (1976)

59. Langard, S., Norseth, T.: Chromium. In: Handbook of the Toxicology of Metals, L. Friberg et al. (edit.), 383-397 (1979) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

60. Schroeder, H.A., Balassa, J.J., Tipton, I.H.: J. Chron. Dis. 15, 941-964 (1962)

61. Iyengar, G.V.: Presampling factors in the elemental composition of biological systems. Anal. Chem. 54/4, 554A-559A (1982)

62. Vielstich, W., Barz, F.: Zum Studium von Reaktionen und Stofftransport an rotierenden Elektroden. Chem. Ing. Tech. 49/4, 299-305 (1977)

63. Landy, M.P.: An evaluation of DPASV at a rot. glassy carbon electrode for the determination of Cd, Cu, Pb and Zn in antarctic snow samples. Anal. Chim. Acta 121, 39-49 (1980)

64. Osteryoung, P.A., Christie, J.H.: Theoretical treatment of pulsed voltamm. stripping at thin Hg-film electrodes. Anal. Chem. 46/3, 351-355 (1974)

65. Myers, D.J., Osteryoung, R.A.: Pulse voltammetrie at rotated electrodes. Anal. Chem. 46/14, 2089-2092 (1974)

66. De Loos-Vollebregt, M.T.C., De Galan, L.: Theory of Zeeman-atomic-absorption-spectrometry. Spectrochimica Acta 33B, 495-511 (1978)

67. Fernandez, F.J., Myers, S.A., Slavin, W.: Background correction in atomic absorption spectroscopy utilizing the Zeeman-Effect. Anal. Chem. 52, 741-746 (1980)

68. Schmid, W., Dietl, F., Sansoni, B.: GSF-Bericht 371, 16 (1975) Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung mbH, München

69. Berlin, M., Hammarström, I., Maunsbach, A.B.: Microautoradiographic localisation of water-soluble Cd in mouse kidney. Acta Radiol. 2, 345-352 (1964)

70. Fox, M.R.S., Cadmium-metabolism - A review of aspects pertinent to evaluating dietory Cd intake by man, In: Trace Elements in Human Health and Disease, Vol. II, A.S. Prasad (edit.), 401-416 (1976) Academic Press, New York

71. Piscator, M., The chronic toxicity of Cadmium, In: Trace Elements in Human Health and Disease, Vol. II, A.S. Prasad (edit.), 431-441 (1976) Academic Press, New York

72. Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G., Kjellström, T., Cadmium in the Environment, 2nd edition, 1-248 (1974) CRC Press, Cleveland/Ohio

73. Welz, B., Atomic Absorption Spectroscopy, 8-10 (1976) Verlag Chemie, Weinheim, New York

74. NSI-Hitachi Application Note PZ-1, NSI-Hitachi scientific instruments, Sunnyvale/California

75. Valenta, P., Mart, L., Nürnberg, H.W., Stoeppler, M.: Voltammetrische simultane Spurenanalyse toxischer Metalle in Meerwasser, Binnengewässern, Trink- und Brauchwasser. Jahrbuch vom Wasser 48, 89-107 (1976)

76. Kasperek, K.: Die Neutronenaktivierungsanalyse und ihre Anwendung zur Bestimmung von Spurenelementen in der Medizin, 1-13 interne Veröffentlichung 11/1977, Institut für Medizin, KFA Jülich GmbH

77. Iyengar, G.V.: On multielement analysis of biological samples with the aid of neutron activation, Report SLV-IRB-50, 38 (1980) Swedish University of Agricultural Sciences, Depart. of Radiobiology, Uppsala

78. Iyengar, G.V.: Procedure and Development Aspects of a Multielement Automatic Radiobiochem. Machine, Applied to NIBS 25, interne Veröffentlichung 6/1976, KFA Jülich GmbH

79. Berchtold, P., Gries, F.A., Kohlenhydratstoffwechsel mit Ausnahme der diabetischen Ketoacidose und Hyperosmolarität; In: G. Riecker, Therapie innerer Krankheiten, 350 (1980), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

80. Seiller, W., Echsel, H., Hohenegger, M.: Zur Wirkung von Cadmium auf Gewebeatmung und Glukoneogenese in der Nierenrinde von Ratten. Arch. Toxicol. 42, 217-222 (1979)

81. Cadmium-Bericht - Ein Beitrag zum Problem der Umweltbelastung durch nicht- oder schwer abbaubare Stoffe, dargestellt am Beispiel Cadmium. Texte 1/81, Umweltbundesamt (Hrsgb.), Berlin (1981)

82. Tölg, G., Möglichkeiten und Grenzen der Spurenelement-Analytik; In: Spurenelemente - Analytik, Umsatz, Bedarf, Mangel und Toxikologie, E. Gladtke, G. Heimann, J. Eckert (Hrsg.), 3-8 (1979) Thieme-Verlag, Stuttgart

83. Rehne, D., Brätter, P., Geßner, H., Hube, G., Mertz, W., Rösick, U.: Problems in the determination of Chromium in biological materials. Comparison of Flameless Atomic Absorption Spectrometry and Neutron Activation Analysis. Z. Anal. Chem. 278, 269-272 (1976)

84. Kumpulainen, J.: Effect of volatility and adsorption during dry ashing on the determination of Chromium in biological materials. Anal. Chimica Acta 81, 403-405 (1977)

85. Rabinowitz, M., Gonick, H., Levin, S., Davidson, M.: Effects of Chromium and yeast supplements on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic men. Diabetes Care 6/4, 319-327 (1983)

D A N K S A G U N G

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Reinauer für seine großzügige Unterstützung und Betreuung sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Darüberhinaus danke ich Herrn Dr. Iyengar vom Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich für die Durchführung der NAA-Messungen und viele anregende Diskussionen, Herrn Jermann vom Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf für eine Reihe praktischer Hinweise beim Aufschluß der Serumproben und Herrn Neugebauer von der biometrischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts für die statistische Auswertung der Daten.

L E B E N S L A U F

7.9.1950	geboren in Dorste, Kr. Osterode/Harz, als Sohn des Bankangestellten Bruno Schütze und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Gerlitz
1951	Übersiedlung nach Düsseldorf
1956 - 1960	Städtische Volksschule Helmholtzstraße in Düsseldorf
1960 - 1969	Städtisches Geschwister-Scholl-Gymnasium
1969	Allgemeine Hochschulreife
1969 - 1971	Ausbildung zum pharm.-techn.-Assistenten in der Apotheke der Universitätskliniken Düsseldorf
Dezember 1971	pharmazeutisches Vorexamen
1972 - 1973	Tätigkeit als pharm.-techn.-Assistent in der Bahnhof-Apotheke, Düsseldorf
SS 1973 - SS 1978	Chemiestudium an der Universität Düsseldorf
Februar 1976	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
SS 1976 - SS 1981	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
Oktober 1981 - September 1982	Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Düsseldorf-Gerresheim
April 1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 1983	Approbation als Arzt
August 1983 - November 1983	Tätigkeit als Assistenzarzt im Fachbereich Innere Medizin, St.-Martinus-Krankenhaus, Langenfeld
seit Dezember 1983	Tätigkeit in der klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts an der Universität Düsseldorf